

## SCREEN FOR COMPOUNDS WITH AFFINITY FOR RNA

Patent Number: WO9709342  
Publication date: 1997-03-13  
Inventor(s): ARENAS JAIME E.; LILLIE JAMES W.; PAKULA ANDREW A  
Applicant(s): SCRIPTGEN PHARM INC (US)  
Requested Patent: ☐ WO9709342  
Application Number: WO1996US14729 19960906  
Priority Number(s): US19950003406P 19950908  
IPC Classification: C07H21/02; C07H21/04; C12Q1/68; G01N33/48  
EC Classification: C12Q1/68A8, C12Q1/68B2B  
Equivalents: CA2203832, ☐ EP0791008 (WO9709342), A1, JP10509053T  
Cited Documents: US5496938; US5514546; US5561222

### Abstract

The present invention provides methods for high-throughput screening for bioactive compounds, in particular those that bind to RNA sequences involved in the pathogenesis of disease or in regulation of a physiological function. The methods involve measuring the conformation of an RNA target in the presence and absence of test ligands, and identifying as a ligand any test ligand that causes a measurable change in target RNA conformation.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-509053

(43) 公表日 平成10年(1998) 9月8日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 66 頁)

(21) 出願番号 特願平9-511466  
(86) (22) 出願日 平成8年(1996) 9月6日  
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 5月7日  
(86) 国際出願番号 PCT/US 96/14729  
(87) 国際公開番号 WO 97/09342  
(87) 国際公開日 平成9年(1997) 3月13日  
(31) 優先権主張番号 60/003, 406  
(32) 優先日 1995年9月8日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP

(71) 出願人 スクリプトジェン・ファーマスーティカルズ, インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02155, メッドフォード, ポストン・アヴェニュー・200

(72) 発明者 アリナズ, ジェイム・イー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02173, レキシントン, レッジローン・アヴェニュー・26

(74) 代理人 弁理士 酒井 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNAに対する親和性を有する化合物のためのスクリーン

(57) 【要約】

本発明は、生物学的活性化合物特に疾患の病原又は生理学的機能の調節に関与するRNA配列に結合するものの高処理量スクリーニング方法を提供する。前記方法は、RNA標的のコンホメーションをテストリガンドの存在下及び非存在下で測定し、標的RNAコンホメーションにおける測定可能な変化を起こすいずれかのテストリガンドをリガンドとして識別することを含む。

## 【特許請求の範囲】

1. 所定の標的RNA配列に結合するリガンドを識別するための高処理量方法であって、

(a) 前記標的RNA配列に結合することが不明の複数の化合物をテストリガンドとして選択し；

(b) 前記標的RNA配列をそれぞれの前記テストリガンドの存在下で保温してテスト組み合わせを作製し；

(c) 前記標的RNA配列をテストリガンドの非存在下で保温してコントロール組み合わせを作製し；

(d) それぞれの組み合わせにおいて前記標的RNA配列のコンホメーションを測定し；

(e) リガンドとして、コントロール組み合わせにおける前記標的RNAコンホメーションに比べてテスト組み合わせにおいて前記標的RNAコンホメーションにおける測定可能な変化を起こすいずれかのテストリガンドを選択し；

(f) 複数の前記テストリガンドについて工程(b) - (e)を繰り返し、前記標的RNA配列に結合するリガンドを識別する工程を含む方法。

2. 請求項1記載の方法であって、前記標的RNAコンホメーションにおける前記測定可能な変化が、前記標的RNAコンホメーションにおける、少ない重畳から多い重畳への、多い重畳から少ない重畳への、又は第1の重畳コンホメーションから第2のオルタナティブ重畳コンホメーションへの変化を含む方法。

3. 請求項1記載の方法であって、前記テスト及びコントロール組み合わせを、前記コントロール組み合わせにおける前記標的RNA配列の検出可能なフラクションを変性させる条件に供する工程をさらに含む方法。

4. 請求項3記載の方法であって、前記供する工程が、温度の変更、塩濃度の変更、変性化合物の添加及びこれらの組み合わせのうち少なくとも1つを含む前記方法。

5. 請求項1記載の方法であって、前記標的RNAが長さ約5から約500ヌク

レオチドである方法。

6. 請求項1記載の方法であって、前記標的RNAが、放射核種、蛍光化合物、親和性標識及びこれらの組み合わせからなる群より選択される標識を含む方法。

7. 請求項1記載の方法であって、前記測定工程が：

(i) 前記テスト及びコントロール組み合わせを、オリゴヌクレオチドが標的RNA配列の所定のコンホメーションと優先的にハイブリダイズする条件下でオリゴヌクレオチドと接触させる工程；及び

(ii) 前記オリゴヌクレオチドとのハイブリッド中に存在する前記標的RNA配列のフラクションを測定する工程を含む方法であって、(ii)において測定される前記フラクションが前記所定のコンホメーションにある標的RNAのフラクションを示す方法。

8. 請求項7記載の方法であって、前記オリゴヌクレオチドが、放射核種、蛍光化合物、親和性標識及びこれらの組み合わせからなる群より選択される標識を含む方法。

9. 請求項1記載の方法であって、前記標的RNA配列がさらに第1の蛍光プローブ及び第2の蛍光プローブを含み、

(i) 前記第1のプローブの前記蛍光放出波長の最大が前記第2のプローブの蛍光吸収波長の最大と重なり、

(ii) 前記第1のプローブ及び第2のプローブが標的RNA内に位置し、それにより第1及び第2のプローブ間の蛍光エネルギー転移が、標的RNAが所定のコンホメーションにある場合のみ起こる方法。

### 【発明の詳細な説明】

RNAに対する親和性を有する化合物のためのスクリーン

#### 発明の属する分野

本発明は、医薬化合物、特に疾患の病因または生理学的機能の調節に関係するRNA配列に結合するものの新規な高処理量スクリーニングの方法に関する。

#### 発明の背景

医薬は、核酸又は蛋白受容体等の標的に対するランダムスクリーニング工程によって識別される導入化合物(lead compound)から開発することができる。大規模スクリーニングの手法は多くの要因によって複雑化する。第1に、多くのアッセーは、実施に骨が折れるか、または高価である。アッセーには、入手や維持が困難かまたは費用がかかる実験動物、細胞株もしくは組織培養が関与することがある。これらを考慮すると、無理なくスクリーニングできる化合物の数は、実際にはしばしば制限される。したがって、ランダムスクリーニングの方法を用いる者は、ある程度の予備知識によっておそらく有効であろうと示唆される化合物の調査を頻繁に制限される。このストラテジーはテストされる化合物の範囲を制限し、多くの有用な薬剤が見落される可能性がある。

さらにまた、多くの生化学アッセーの特異性によって広い多様性を有する有用な化学物質が除外される可能性がある。なぜならば、リガンドと標的との間の相互反応はアッセーの視野外にあるからである。そのような特定のアッセーを用い

ると、多くの可能性のある医薬が検出できない可能性がある。

最後に、薬物発見のための現存するほとんどの生化学的スクリーニング手法の場合、スクリーニングを始めることができる前に、問題とされる系がよく特徴付けられていなければならない。結果として、多くの標的に対する治療薬の生化学的スクリーニングは、詳細な生化学的特徴付けを待たねばならず、これは一般に広範囲の研究を必要とする。

本発明は、特に、有用なリガンドの識別のための高処理量スクリーニング方法におけるRNA標的の使用を含む。本発明は、自然発生的な、及び合成のRNA分子における高次構造の存在を利用する。例えば、RNAは、一本鎖及び二重ら

せん構造の両方で存在する。これら二重の構造は、ループ、バルジ、塩基三つ組 (base triples) 及びらせん間の接合 (junctions) により歪められうる。RNA の構造的多様性は、DNA のそれよりはるかに多く、蛋白のそれと同様であり、RNA を低分子物質の結合の標的としやすくしている (Wyatt and Tinoco, 1993 に概説される)。

低分子物質は、RNA と高い親和性及び特異性をもって結合することができ、結合した RNA の本質的な機能をブロックすることができる。そのような分子の最もよい例は、エリスロマイシン及びアミノグリコシド等の抗生物質である。いくつかの抗生物質的翻訳阻害剤が RNA と特異的に相互作用することの第1の示唆は、16S RNA のメチル化に対するカナマイシン及びゲンタマイシンに対する耐性の遺伝子マ

ッピングであった (Thompson et al., Mol. Gen. Genet. 201:168, 1985)。エリスロマイシンは細菌 RNA に結合し、ペプチデル- t RNA 及び mRNA を放す (Menninger et al., Mol. Gen. Genet. 243:225, 1994)。2-DOS 含有アミノグリコシドは、RRE として知られる HIV RNA の構造に特異的に結合し、HIV Rev 蛋白のこの RNA への結合をブロックし、それにより組織培養細胞中の HIV 複製を阻害する (Zapp et al., Cell 74:969, 1993)。さらに、アミノグリコシドは長らく翻訳阻害剤として開発されてきたが、つい最近になって、それらは蛋白の非存在下で rRNA へ結合することが示された (Purohit and Stern, Nature 370:659, 1994)。ヒグロマイシン B は、コロナウイルスの RNA 合成を阻害するが、これはウイルス RNA と結合しウイルス RNA の翻訳を特異的にブロックすることによると考えられている (Macintyre et al., Antimicrob. Agents Chemother. 35:2630, 1991)。

存在する核酸のリガンドのアッセー、例えば平衡透析、示差走査熱量測定法、粘度測定分析又は UV 融解等は、高処理量の応用において使用されていない。従って、本発明に先立ち、RNA の非オリゴヌクレオチドリガンドのためのランダムスクリーニングの手法は、いくつかの先行する知識により有効であるかもしれないと示唆される化合物に限定されていた。このストラテジーは成功している (Z

app et al., 1993)が、実地的なスケールでテストできる化合物の範囲が限定される。

米国特許明細書第5, 270, 163号には、特定の標的に結合するオリゴヌクレオチドの識別のためのセレックス (SELEX) システムが記載される。このシステムにおいて、ランダムオリゴヌクレオチドは、親和性で選択され増幅され、続いて再選択及び増幅が何回か繰り返される。しかしながらこの方法は、オリゴヌクレオチドリガンドに限定され、逆に応用すること、即ち核酸に結合する非オリゴヌクレオチドリガンドを調査することができない。

米国特許明細書第5, 306, 619号には、特定のDNA標的配列に結合する化合物を識別するスクリーニング方法が記載される。この方法では、標的配列が知られた蛋白結合DNA配列に隣接して配置され、テストされる核酸が構成される。続いて、テスト化合物の、同一起源の蛋白の蛋白結合DNA配列への結合における効果が測定される。この方法は、DNAハイブリッドの融解とDNA構造の展開 (unfolding) が起きない条件を必要とする。対照的に、RNAは、塩基の対形成及び全体のコンホメーションのパターンにおいてずっと劇的な多様性に耐えることができる。

従って、当該分野において、多くの数の非オリゴヌクレオチド低分子物質の、それらの生理学的、医学的又は商業的に顕著なRNA分子への結合能力についてのランダムスクリーニングのための効率的で経費のかからない高処理量の方法が必要とされている。

#### 発明の要約

本発明は、いずれかの所定の標的RNAに結合するリガン

ドを識別する高処理量スクリーニング方法を含む。当該方法は：標的RNA配列と結合することが不明の複数の化合物をテストリガンドとして選択し；該標的RNA配列をテストリガンドのそれぞれと保温 (incubating) してテスト組み合わせを作製し；該標的RNA配列をテストリガンドの非存在下で保温してコントロール組み合わせを作製し；それぞれの組み合わせにおける標的RNAのコンホメー

ションを測定し；リガンドとして、コントロール組み合わせに比べてテスト組み合わせにおいて標的RNAコンホメーションの測定可能な変化を起こすいずれかのテストリガンドを選択し；複数の前記テストリガンドについて該方法を繰り返して標的RNA配列に結合するリガンドを識別する；工程により行われる。本発明の方法により識別されたりガンドは、標的RNAの、重畳された(folded)程度のより少ないコンホメーションからより多いものへ、重畳された程度のより多いコンホメーションからより少ないものへ、又は第1の重畳コンホメーションから第2のオルタナティブ重畳コンホメーションへの、変化を起こしうる。さらに、テスト及びコントロール組み合わせは、リガンドの非存在下において（即ちコントロール組み合わせにおいて）標的RNAの測定可能なフラクションを変性させる条件に供することができる。

本発明の実施にあたり、標的RNAの重畳状態へのテストリガンドの効果は、相補的(complementary)オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション、コンホメーション特異的ヌクレアーゼによる処理、一本鎖又は二重らせん核酸に特異

的なマトリクスへの結合、及び蛍光プローブ間の蛍光エネルギーの転移を制限無く含む良く知られた方法を用いて決定される。1つの実施態様において、標的RNAは放射標識され、標的RNAの特定のコンホメーションに優先的にハイブリダイズするビオチニル化したオリゴヌクレオチドと保温され；ビオチニル化分子を固定化ストレプトアビジンを用いて捕捉するのに続いて、ハイブリダイゼーションの程度を、固定化放射標識の測定により容易に定量することができる。他の実施態様において、標的RNAは、第1のプローブの蛍光放射波長の最大が第2のプローブの蛍光吸収の最大と重なる、2つの異なる蛍光プローブを含む。プローブは、標的RNA内に位置し、それによりプローブ間の蛍光エネルギー転移の効率が標的RNAのコンホメーションに依存する。

上記のいずれか又は他の方法により検出される標的RNAコンホメーションの「測定可能な変化」とは、テスト及びコントロール組み合わせにおいて測定されたパラメーターの違いがランダムな統計的変動により期待されるものより大きいものである。



### 図面の簡単な説明

図1は、ビオチニル化した相補的オリゴヌクレオチドと標識された標的RNAとの間の反応の図示的な説明である。

図2は、標的RNAに対し相補的なビオチニル化オリゴヌクレオチドと関連したストレプトアビジン被覆プレートの使用の図示的な説明である。

図3は、モデル標的RNAの異なるコンホメーションの図

示的な説明である。

図4は、RNA構造のモニターのための分子内蛍光エネルギー転移の使用の図示的な説明である。

図5は、ハイブリダイゼーションのモニターのための分子内蛍光エネルギー転移の使用の図示的な説明である。

図6は、ヌクレアーゼ切断の、オルタナティブ標的RNAコンホメーションに対する効果の図示的な説明である。

図7は、RNA:DNAハイブリッドの測定のためのビオチニル化され標識された標的RNAと関連したRNAアーゼH切断の使用の図示的な説明である。

図8は、RNA:DNAハイブリッドの測定のためのビオチニル化され標識されたオリゴヌクレオチドと関連したS1ヌクレアーゼの使用の図示的な説明である。

図9は、AB-RNAの構造(上)及びAB-RNAのATP又は相補的オリゴヌクレオチドとの反応(下)の図示的な説明である。

図10は、放射標識したAB-RNAの相補的DNAオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションにおけるATPとUTPの効果を示す、ネイティブポリアクリルアミドゲルのオートラジオグラムを表す。

図11は、AB-RNA:ビオチニル化DNAハイブリッドのストレプトアビジン被覆常磁性ビーズへの結合における、ATP及びUTPの効果の図示的な説明である。

図12は、ニトロセルロースフィルターへの、放射標識RRE RNA及びビオチニル化相補的DNAオリゴヌクレオ

チド間のハイブリッドの結合における、通増する量のストレプトアビジン (SA)、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (SA:AP)、又はストレプトアビジン-ベータガラクトシダーゼ (SA:BG) の添加の効果の図示的な説明である。

図13Aは、ニトロセルロースフィルターへの、放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的91Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッドの結合における、通増する濃度のオリゴヌクレオチド91Bの添加の効果の図示的な説明である。

図13Bは、放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的91Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成の時間経過の図示的な説明である。

図13Cは、放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的91Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、通増する濃度のtRNA添加の効果の欠損の図示的な説明である。

図13Dは、放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的91Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、通増する濃度の塩化ナトリウムの添加の効果の図示的な説明である。

図14Aは、100 nM標的RNA及び250 nMオリゴヌクレオチドを用いた、放射標識HIV RRE RNA及びビオチニル化オリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成の時間経過の図示的な説明である。

図14Bは、25 nM標的RNA及び50 nMオリゴヌク

レオチドを用いた、放射標識HIV RRE RNA及びビオチニル化オリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成の時間経過の図示的な説明である。

図14Cは、HIV RRE RNA標的 (全長が左に示される) の構造の図示的な説明である。太字の大文字は、オリゴヌクレオチド91B、92A、99A、92B及び92Cに相補的な配列を示す。

図15は、放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的67Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、通増する濃度のATP又はUTPの効果の図示的な説明である。データは、リガンドの非存在時における反応と比較した際のハイブリッド形成の阻害の百分率として示される。

図16は、RRE RNA及びビオチニル化相補的オリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、示されたジフェニルフラン誘導体の通増する濃度の効果の図示的な説明である。データは、図15と同様に示される。

図17は、RRE RNA及びビオチニル化相補的オリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、ATPの通増する濃度の効果（中黒の四角）；及び放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的67Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、ジフェニルフラン誘導体ST36723の通増する濃度の効果（白抜きの四角）の図示的な説明である。

図18Aは、放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的67Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、

DMSOの通増する濃度の効果の図示的な説明である。

図18Bは、5mM ATPによる放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的67Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成の阻害の程度における、DMSOの通増する濃度の効果の図示的な説明である。

図18Cは、放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的67Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、ジチオスレイトールの通増する濃度の効果の図示的な説明である。

図18Dは、放射標識AB RNA及びビオチニル化相補的67Bオリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成における、エタノール及びメタノールの通増する濃度の効果の図示的な説明である。

図19は、上記図18の通り行われた（5%DMSO）SCANアッセーの再現能(reproducibility)の図示的な説明である。

図20（上図）は、使用されるビオチニル化オリゴヌクレオチドに相補的な配列を太字大文字で示した、ATP結合標的RNAの説明である。下図は、平衡条件下での、ハイブリッド形成（A）及び解離（D）の時間経過の図示的な説明である。

図21は、ATP存在下及び非存在下でのAB RNA吸着における、温度の効果の図示的な説明である。

図22は、単純な一本ステムループRNA構造の図示的な説明である。

図23は、フルオレセイン及びローダミン標識を含む、相互に排他的な重畳パターンに畳むことができる複合RNA構造の図示的な説明である。

図24は、フルオレセイン及びローダミン標識を含む単純な一本ステムループRNA構造の図示的な説明である。

図25は、フルオレセイン及びローダミンの両方で標識された複合RNA構造及び相補的なDNAオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション反応の図示的な説明である。

図26は、複合標識RNA構造及びビオチニル化オリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション反応の図示的な説明である。

図27は、複合ビオチニル化RNA構造及びRNAの異なる領域に相補的な個々のオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション反応の図示的な説明である。

図28Aは、非標識相補的オリゴヌクレオチド(67B)との保温中の、フルオレセイン標識AB RNAの蛍光の変化の時間経過の図示的な説明である。

図28Bは、図28Aに示された蛍光の逡増におけるATP、GTP及びUTPの効果の図示的な説明である。

#### 発明の詳細な説明

本明細書に引用される全ての特許出願、特許および参考文献は、参照により本明細書に完全な形で含まれる。矛盾が生じる場合には、定義を含め本明細書の記載が優先する。

#### 定義

本明細書で用いられるように、“リガンド”という用語は、

標的RNAに結合する薬剤を指す。当該薬剤は、標的RNAが天然の又はオルタナティブコンホメーションで存在しているとき、または部分的にもしくは全体的に展開もしくは変性(denatured)させられているときに該標的RNAと結合することができる。本発明によれば、リガンドは、標的RNAのどこに結合する薬剤

でもよい。従って、本発明のリガンドは、標的RNAに結合するその能力の他にその中又はそれ自体に明らかな生物学的機能を持たない薬剤も含む。

本明細書で用いられるように、“テストリガンド”という用語は、標的RNAに結合することができるその能力についてテストされる化合物、分子または複合体を含む薬剤を指す。テストリガンドは、金属、ペプチド、蛋白、脂質、多糖類、小型有機分子、ヌクレオチド（自然発生的でないものを含む）およびそれらの組み合わせが制限なく含まれる、実質的にいかなる薬剤であってもよい。小型有機分子は、50ダルトンを超え約2,500ダルトン未満の分子量を有し、最も好ましくは約400ダルトン未満である。好ましくは、テストリガンドは、オリゴヌクレオチドではない。天然産物の抽出物等の物質の複合混合物（1つを超えるテストリガンドを含む可能性がある）もまたテストすることができ、さらに、標的RNAに結合する成分をその後の工程で当該混合物から精製することができる。

テストリガンドは、合成又は天然化合物の大きなライブラリーから得ることができる。例えば、合成化合物のライブラリーは、メイブリッジ・ケミカル社(Maybridge Chemical Co.

, Trevillet, Cornwall, UK)、コムゲネックス(Congenex, Princeton, NJ)、ブランドン・アソシエーツ(Brandon Associates, Merrimack, NH)、及びマイクロソース(Microsource, New Milford, CT)から商業的に入手可能である。希少な化学物質のライブラリーは、アルドリッチ(Aldrich, Milwaukee, WI)から入手可能である。また、バクテリア、真菌、植物及び動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーは、パン・ラブス(Pan Labs, Bothell, WA)又はマイコサーチ(Myco Search, NC)から入手することができ、または容易に製造することができる。さらに、天然の又は合成的に製造されたライブラリー及び化合物は、慣用の化学、物理、及び生化学的手段により修飾することができる。例えば、化合物は効率、安定性、薬剤学的コンパチビリティ等を増強するために修飾することができる。例えば、本発明を使用して一旦ペプチドリガンドが識別されると、それは、その安定性を増強するために、様々な方法で修飾することができる。前記修飾は、D

ーアミノ酸、特にD-アラニン等の非天然アミノ酸の使用により、又はアミノ若しくはカルボキシル末端の官能化例えばアミノ基であればアシル化若しくはアルキル化、カルボキシル基であればエステル化若しくはアミジン化により、又はペプチド鎖を強制的に環状の形態とすることにより、又は当業者によく知られた他のストラテジーにより行うことができる。

本明細書で用いられるように、“標的RNA”という用語は、それに対するリガンドまたは結合相手の識別が求められているRNA配列を指す。標的RNAには、ある疾患、状態

もしくは病的生理状態の病因または生理的機能の調節に関係することが分かっているか、または関係すると信じられている配列が制限なく含まれる。標的RNAは、いずれの生物、例えば脊椎動物、特に哺乳類、さらにはより具体的にヒト、又はウイルス、バクテリア、真菌、原生動物、寄生虫若しくはバクテリオファージ等の由来でもよい。標的RNAは、野生型の配列、又は突然変異若しくは変異の配列を含むことができる。突然変異若しくは変異の配列は、変化した安定性、活性又は他の変異特性を有するもの、又は異種(heterologous)配列が加えられたハイブリッド配列を含む。さらに、本明細書で使用される標的RNAは、例えばビオチン、ペプチド、蛍光分子等の、連結等により化学的に修飾されたRNAを含む。

本発明で使用するためには、標的RNAの配列は典型的には約5～約500 ntの間、好ましくは約30～約100 nt、最も好ましくは約50 ntである。標的RNAは、天然の供給源から単離されたものを用いることができ、また、より好ましくはT7 RNAポリメラーゼ等を用いたもの等の慣用のポリメラーゼ誘導脾細胞系を用いてin vitroで合成されたものを用いることができる。

本明細書で用いられているように、“テスト組み合わせ”とは、テストリガンドと標的RNAの組み合わせを指す。“コントロール組み合わせ”とは、テストリガンド非存在下の標的RNAを指す。

本明細書で用いられているように、標的RNAの“重畳状

態”とは、変性条件の非存在下での、配列の、天然の又はオルタナティブのコンホメーションを指す。重畳状態のRNAは、分子内塩基対の特定のパターン、並びに特定の高次構造の両方を含む。理論によって束縛されることを望むことなく、ある標的RNAが、実験的な条件（緩衝液、温度、リガンドの存在等を含む）に依存して、いくつかのオルタナティブ重畳状態の1つに至ることができると考えられている。

本明細書で用いられているように、標的RNAの「展開状態」とは、重畳状態に比べてRNAが部分的に又は完全に一本鎖にされているか、又は重畳状態において存在しているその構造要素を欠損している状態を指す。本明細書で用いられる「重畳状態」の用語は、部分的又は完全な変性及び構造を失うことを含む。

本明細書で用いられているように、RNAコンホメーションの「測定可能な変化」とは、経験的に決定され、使用されるRNAコンホメーションのモニター方法に依存して変動しうる量を指す。本発明は、差異がランダムな統計的変動により期待される以上である限り、どのような物理的パラメーターにおけるテスト及びコントロール組み合わせの間のどのような差異をも含む。

本発明は、標的RNAに結合するリガンドを識別するための高処理量スクリーニング方法を含む。テストリガンドが結合する標的RNAが疾患または状態に付随するか、または原因となる場合、該リガンドは、疾患または状態の診断、予防または治療に有用かもしれない。本方法によって識別される

リガンドはまた、分離や精製方法として、例えば混合物から標的RNAを精製または分離する方法として用いられるリガンドとすることもできる。本発明はまた、本方法によって識別されるリガンド、およびそれらの治療的使用（診断、予防または処置目的のために）、並びに精製および分離方法における使用にも関する。

本発明によれば、標的RNAに対するリガンドは、分子内重畳の程度若しくはパターン、または標的RNAの重畳もしくは展開の速度に影響を与える能力によって識別される。実験条件は、標的RNAが展開又は再配列に供されるように選択される。テストリガンドがこのような条件下で標的RNAと結合する場合、テ

ストリガンドの存在下での重畳：展開標的RNAの相対量、標的RNAの複数のオルタナティブ重畳状態の1つ又は他の相対量、または標的RNAの重畳もしくは展開速度は、テストリガンドの非存在下で認められるものとは異なる、すなわちより大きいか、または小さいであろう。したがって、本方法は、標的RNAをテストリガンドの存在下および非存在下で保温することを含む。この後、重畳標的RNAに対する展開標的RNAの絶対量もしくは相対量、特異的な重畳コンホメーションの相対量、または標的RNAの重畳もしくは展開速度の分析が実施される。

本発明の重要な特徴は、生物学的活性または機能に緊密に関係する別個の領域だけでなく、標的RNAのどのような領域に結合するどのような化合物も検出するという点である。

本発明を実施する場合、テストリガンドは標的RNAと組み合わせられ、この混合物は適切な条件下で十分な時間維持され、テストリガンドが標的RNAに結合することが許容される。実験条件は、各標的RNAについて経験的に決定される。複数のテストリガンドを調べる場合、殆どのリガンド：標的RNA相互反応が完了すると考えられる保温条件が選択される。一般に、テストリガンドは、標的RNAに対してモル過剰状態で存在する。以下により詳細に述べられる通り、標的RNAは可溶性で存在してもよく、また別に固相マトリックスに結合していてもよい。

標的RNAのリガンドへの結合のために必要な時間は、テストリガンド、標的RNAおよび用いられるその他の条件にしたがって変動するであろう。ある場合には、結合は直ちに発生し（例えば、テストリガンドと標的RNAを組み合わせたとときと本質的に同時）、一方他の例では、テストリガンドー標的RNA組み合わせは、結合検出までもっと長時間（例えば12-16時間まで）維持される。多くのテストリガンドが用いられる場合、殆どのRNA：リガンド相互反応にとって十分な保温時間、典型的には約1時間が選択される。適切な時間は、当業者によって容易に決定される。

それぞれのRNA標的について最適化される他の実験的条件は、アッセー中の



、pH、反応温度、塩濃度及び組成、二価カチオンの濃度及び組成、RNA量、還元剤濃度及び組成、並びに非特異的蛋白及び／又は核酸の包含を含む。化学的又は天然の製造物のライブラリーをスクリーニングする際の重

要な考慮すべき点は、このような材料を再懸濁させるのに一般的に用いられる有機溶媒（例えばジメチルスルホキシド、メタノール又はエタノール）に対するアッセーの応答である。従って、それぞれのRNAは、様々な濃度のこれら有機溶媒の存在下でテストされる。さらに、アッセーは特にある型の化合物、特に、化学及びとりわけ天然製造物のライブラリーに一般的に表れる挿入剤に感受性であるかもしれない。これらの化合物は、しばしば活性はあるが非特異的な阻害活性を有することがある。いくつかの緩衝剤成分及びそれらの濃度が、この問題を見越して特別に選択されるであろう。例えば、ウシ血清アルブミンは、ラジカルと反応し、表面吸着(surface adsorption)を最小化するであろう。非特異的DNA又はRNAの添加もまた、添加しなければアッセーにおいて「ヒット」として記録されてしまう核酸反応分子（例えば、挿入剤等）の効果を最小化するために必要になるかもしれない。

標的RNAへのテストリガンドの結合は、テストリガンドの非存在下及び存在下における重畳の又は展開の標的RNAの絶対量を比較することにより、又は他に、テストリガンドの非存在下又は存在下における重畳：展開標的RNAの比率又は重畳状態の標的RNAの変化、又は標的RNAの重畳又は展開の速度を決定することにより評価される。テストリガンドが標的RNAに結合した場合（即ちテストリガンドが標的RNAへのリガンドである場合）、テストリガンドの非存在下において存在するより、顕著に多い展開の又は少ない重畳の標的RNAが存在しうる（そして、従って展開RNAに

比しての重畳標的RNA比率が高くなる）。または、テストリガンドの結合は、テストリガンドの非存在下において存在するより、顕著に少ない重畳の又は多い展開の標的RNAが存在する結果となりうる。他の可能性は、テストリガンドの結合がオルタナティブRNA重畳構造のパターン又は特性を変化させることであ

る。同様に、テストリガンドの結合は、標的RNAの展開又は重畳の速度を顕著に変化させることを起こしうるか、又はオルタナティブ構造の獲得の速度を変化しうる。

いずれの場合でも、展開の又は重畳の標的RNAの絶対量、重畳：展開比率、又は重畳又は展開の速度の決定は、これらに限定されないが、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション、コンホメーション特異的ヌクレアーゼによる処理、一本鎖又は二重らせん核酸に特異的なマトリクスへの結合、及び隣接する蛍光プローブ間の蛍光エネルギー転移を含むどのような方法を使用して行なうこともできる。他の物理化学的手法も、単独に又は上記方法と関連して用いることもできる。他の物理化学的方法としては、これらに限定されないが、円二色性、紫外及び蛍光分光、及び熱量測定等の測定を含む。しかしながら、それぞれの標的RNAが、特定の検出方法を特定の応用において最も適切なものとする独特な特性を持ちうるものが当業者に認識される。

高処理量スクリーニングの目的で、スクリーニングされる全ての化合物のうちの「陽性」の化合物即ちリガンドと識別されるテストリガンドの閾値割合を得るために実験条件を調

整することができる。この閾値は2つの要件に従って設定される。第1に、陽性化合物の数は、実用的な観点から扱いやすいものである必要がある。第2に、陽性化合物の数は、標的RNAに対する認識しうる親和性を反映する必要がある。好ましい閾値は、総テストリガンドの0.1%から1%がある標的RNAに対するリガンドであると示される場合に得られる。

#### RNAの重畳の検出方法

本発明は、当該技術においてよく知られた多くの検出方法のうちのどのようなものを用いて行うこともできる。例えば、オリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)を、RNAが展開コンホメーションをとる場合だけ又は他の重畳コンホメーションにおける一本鎖領域にだけ特定のRNA標的とハイブリダイズするよう設計することができる。いくつかの実施態様において、オリゴヌクレオチドの標的RNAへのハイブリダイゼーションは、テストリガンドの非存在下又は存在下に

において（即ち、それぞれコントロール又はテスト組み合わせにおいて）進むことが許容され、その後ハイブリダイゼーションの程度は当該技術においてよく知られる方法のいずれかを用いて測定される。典型的には、コントロール組み合わせに比べてのテスト組み合わせにおけるランダムな統計的変動により期待される量を超えて大きなハイブリダイゼーションの増加又は減少は、テストリガンドが標的RNAと結合することを示す。標的RNAの重畳の程度を測定する他の有用な方法は、これらに限定されないが、分子内蛍光エネルギー転移、

コンホメーション特異的ヌクレアーゼによる切断、一本鎖又は二重らせん核酸に特異的な材料（ニトロセルロース又はヒドロキシアパタイト等）との結合、RNA重畳構造を示す生物物理学的特性（UV、ラマン又はCDスペクトラム、固有（intrinsic）蛍光、沈降速度、又は粘度）の測定、熱及び／又はホルムアルデヒド変性に対する重畳RNAの安定性の測定（分光測定又はヌクレアーゼ感受性等の方法を使用したもの）、及び隣接したリポーターRNAへの蛋白の結合の測定を含む。これらの方法の例は、以下の論文に開示される：Kan et al., Eur.J.Biochem. 168:635,1987(NMR); Edy et al., Eur.J.Biochem. 61:563,1976, Yeh et al., J.Biol.Chem.263:18213,1988, Clever et al., J.Virol. 69:2101,1995, 及びVigne et al., J.Mol.Evol. 10:77,1977(RNAアーゼ); Millar, Biochim.Biophys.Acta 174:32,1969(熱融解、蛍光分極(fluorescence polarization)); 及びZimmerman Biochem.Z. 344:386,1966 及びDupont et al., C.R.Acad.Sci.Hebd.Séances Acad.Sci.D. 266:2234,1968(粘度)。

#### 1. ゲルシフト

名目上は低処理量方法であるが、ゲルシフトの手法は、それぞれの特定標的RNAに使用されるオリゴヌクレオチドに基づく方法のためのアッセイ配置の初期選択の重要な道具である。典型的には、標的RNAは、テンプレートとしてT7-RNAポリメラーゼプロモーターの配列とそれに続く標的RNAをコードする領域を含むDNA、及び $[^{32}\text{P}]$ -UTPを使用してin vitroで転写されて放射標識RNAが作成さ

れる。オリゴヌクレオチドテンプレートを用いたT7RNAポリメラーゼ転写反応のための条件は、Milligan et al., Nuc.Acids Res., 15:8783,1987に記載されている。[ $^{32}$ P]-標識標的RNAは最適には、90℃で2分間熱変性され、氷上で2分間冷却され、その後一部をテストリガンドの非存在下及び存在下で、通増する濃度の相補的オリゴヌクレオチド中で保温する。反応混合物は、続いて、テストリガンド含有か非含有のポリアクリルアミドネイティブゲルで分析される。

テストリガンドが標的RNAに結合する場合、それは標的及び相補的オリゴヌクレオチド間のハイブリッド形成を阻害するであろう。この方法の例は、以下の実施例1に記載される。

## 2. ストレプトアビジン-ビオチンを使用した高処理量アッセイ

これらの実施態様において、ビオチン部分(biotin moiety)が相補的オリゴヌクレオチドへ、又は標的RNAへ導入される。これにより、ビオチンとアビジン、ストレプトアビジン(SA)又は他のビオチン結合蛋白誘導体との間の強い相互作用に基づく捕捉手法(capture methods)の使用が許容される(Wilcheck et al., Meth.Enzymol.,184:5-45,1990)。図1は、ビオチニル化オリゴヌクレオチド及び標識化RNA標的の使用を説明する。ビオチニル化オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした標識化RNA標的分子のみが、ビオチン結合蛋白と関連することができる。

ビオチン部分は、オリゴヌクレオチドのどの位置に設けてもよく、またオリゴヌクレオチド分子あたり複数のビオチン部分があってもよい。SA (またはその誘導体若しくは類似物)を、共有結合的に固体支持体に付着させることができ、またはそれは溶液中に自由状態に添加することができる。標的RNAは例えば放射標識することができ、又はフロオレセイン又はローダミン等のフルオロフォア又は他の容易に測定できる標識で標識化することができる。

SA被覆プレート：図2は、SAで被覆された商業的に入手可能(Pierce, Rockford, IL)な96ウェルプレートの使用を説明する。反応は第1に、通常非被覆96ウェルプレート内において、標識RNA標識をビオチニル化オリゴヌクレ

オチド及びテストされるリガンドと混合することによりセットアップされる。保温期間後、反応混合物は、S A被覆プレートに移され、ビオチン部分がS Aへ結合することを許容する。標的RNA：オリゴヌクレオチドハイブリッド及び自由ビオチニル化オリゴヌクレオチドはS A-ビオチン相互作用を介してプレートの壁に結合するであろう。オリゴヌクレオチドと関連しない標的RNAを含む非結合材料は、過剰な緩衝液により洗い落される。洗浄後プレートに残った標的RNAは標的RNA中の標識の性質に応じた適切な方法で定量される。

S A被覆ビーズ：この実施態様において、S Aは、例えばセファロース(Pharmacia, Uppsala, Sweden)、アガロース(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)又はアフィゲル(BioRad,

Hercules, CA)等の不活性材料でできた小さなビーズに共有結合的に付着される。定められた量のビーズを、反応混合物を含むそれぞれのウェルに添加し、ハイブリッドの結合を許容する。ビーズはその後洗浄され、非結合材料を定量の前に除去する。

S A被覆常磁性ビーズ：S Aビーズを使用した場合の必要とされる洗浄工程は、常磁性S A被覆ビーズ(PMP-S A)を使用することにより容易とすることができる。これらのビーズは商業的に入手可能であり(Promega, Madison, WI)、磁力により濃縮及び保持することができる。洗浄工程の間にプレートの下に磁石をおくことにより、洗浄操作の間にウェルの底部にビーズが濃縮され保持され、ビーズの損失を防ぎより速い操作を許容する。この方法の使用の例は下記実施例2に記載される。

S A被覆SPAビーズ及びシンチラント含有プレート：シンチレーション近接アッセー(scintillation proximity assay, SPA)は、アマシャム社(Amersham Corp., Arlington Heights, IL)より入手可能な、ハイブリダイゼーションの測定に使用しうる技術である。S A被覆SPAビーズは、接近した近位の低エネルギー同位体により励起されうる固相シンチラントを含む。この実施態様において、標的RNAは<sup>3</sup>H (この弱い放射エネルギーは、シンチラントによってシグナルが増幅されない限り、1ミクロンを超える距離において実質的に検出不可能で

ある)で標識される。SPAビーズを使用した場合、SA-SPAビーズに結合したこれら放射標

識された分子のみが、シンチラントが検出するシグナルを放出させるのに十分に近くなる一方、溶液中のこれら分子はシグナルに貢献しないであろう。従って、ビオチニル化オリゴヌクレオチド及び<sup>3</sup>H標識RNA標的を使用することにより、SA-SPAビーズを反応系に添加してその後短い保温期間の後にLSCカウンターで計測することにより、反応において形成されたハイブリッドの量を決定することが可能となる。SAで被覆されたプレート(ウェル表面に付着したシンチラントを含む)もまた商業的に入手可能であり(Scintiplates(商標), Packard, Meriden, CT)、SA-SPAビーズの代わりにこのアッセイに用いることができる。

ニトロセルロースフィルターへの吸着: この実施態様は、多くの蛋白は強固にニトロセルロースフィルターを吸着する事実を利用する。ビオチニル化オリゴヌクレオチド及び標識化標的RNAを使用する場合、自由SA又はSA:アルカリホスファターゼ連結体(conjugates)(SA:AP)、SA:βガラクトシダーゼ(SA:BG)、又は他のSA-連結体等のSA誘導体又は融合蛋白が、反応系に添加され、オリゴヌクレオチドのビオチン部分への結合を許容する。続いて、反応系は、96ウェルニトロセルロースフィルタープレート(Millipore, Bedford, MA, HATF or NC)を通して濾過される。ビオチニル化オリゴヌクレオチドへハイブリダイズされた標識化標的RNAは、SA又はその誘導体のフィルターへの吸着を介しフィルターに保持され、一方ハイブリダイズされなかったRNAは通過する。SAは、ニトロセルロースに対し

での結合が乏しいことが見いだされている; しかしながら、本発明者らは、SA連結体又は融合蛋白の使用は蛋白のニトロセルロースへの吸着を増加させることを発見した。従って、SA融合蛋白又は連結体の使用が好ましい。この方法の使用の例は、下記実施例3に記載されている。

### 3. 共有結合的に付着した蛋白を使用した高処理量アッセー

ポリペプチド及び蛋白を、カルボジイミドで処理され、ポリペプチド及び蛋白中のものを含むアミンと容易に反応しうる、活性化5' -スホリミダゾリド誘導体を形成した核酸の5' -末端に共有結合的に付着させることができる(Chu et al., Nuc. Acids Res., 11:6513,1983)。この手法を使用して、選択されるどのペプチド又は蛋白をも、本発明において使用されるRNA標的又は相補的オリゴヌクレオチドの5' 末端に共有結合的に付着させることができる。この技術を使用する非限定的な実施態様の例は、以下に記載される。

ニトロセルロースフィルターへの吸着：共有結合的にオリゴヌクレオチドに付着したペプチド又は蛋白と標識化したRNA標的とで、又は、逆に、RNA標的に共有結合的に付着したペプチド又は蛋白と標識化オリゴヌクレオチドとで、ハイブリダイゼーションを、SAによるビオチン含有ハイブリッドのニトロセルロースフィルターにおける捕捉について上に記載されたのと本質的に同一の方法で定量することができる。しかしながらこの場合、フィルターへの結合は、RNA標的又はオリゴヌクレオチド中のペプチド又は蛋白付着物を介する。

固体支持体への親和性結合：SA-ビオチンの使用について上に記載される全ての技術を、SA及びビオチンの代わりに多くの他の親和性ペアのいずれかを使用して反復することができる。オリゴヌクレオチド(又は標的RNA)に付着した付着物「Y」は、固体支持体に付着した特定の分子「X」と高親和性結合することができる。高分子又はこれらの誘導体の付着のための活性化樹脂(ビーズ)及び96ウェルプラスチックプレートは、商業的に入手可能である(Dynatech, Chantilly, VA)。X及びYは、抗原-抗体、蛋白-蛋白、蛋白-基質及び蛋白-核酸の対を含む多くの組み合わせとすることができる。これらの対のいくつかは、以下の表に示される。

X	Y
抗原／エピトープ	特異的抗体
蛋白 A	免疫グロブリン
グルタチオン	グルタチオン-S- トランスフェラーゼ
マルトース	マルトース結合蛋白
RNA 又は DNA モチーフ	特異的モチーフ結合蛋白

多くの場合、対のいずれかの成分をRNA標的（又はオリゴヌクレオチド）に付着させることができ、一方他方を固体支持体に付着させることができる。しかしながら、特異的RNA又はDNA結合蛋白が使用される場合、蛋白を固体支持体に付着させることが好ましく、一方蛋白が結合する特異的配列モチーフをRNA標的又はオリゴヌクレオチドの配列中のいずれか便利な位置に合成の過程で組み込むことができる。次に、蛋白の固体支持体への付着は、代わりに（上記のような）ニトロセルロースフィルターへの吸着が使用される場合には省略することができる。

#### 4. 蛍光エネルギー転移 (FET) を使用した高処理量アッセー

フルオレセイン、ローダミン及びクマリン等のフルオロフォアは、特徴的な励起及び放出スペクトルを有している。蛍光エネルギー転移は、一方（ドナー）の放出スペクトラムが、他方（アクセプター）の励起スペクトラムと重なるフルオロフォアの対の間に起こる。適切に選ばれた蛍光分子の対において、ドナープロープの放出は、接近した近位のアクセプタープロープの存在により減少する。これはドナーからアクセプターへの直接のエネルギー転移のためである。従って、プロープが間隔的に近い場合、ドナープロープによって吸収される波長における励起において、プロープ単独の場合に比べてドナー放出の減少及びアクセプター放出の増加が観察される。換言すれば、ドナーの放出蛍光は、アクセプターによって減弱され、代わりにより高い波長の蛍光を放出する。しか



しながらFETはドナーとアクセプターが接近した近位にあるときのみ有効である。エネルギー転移の効率は、ドナーとアクセプタープローブとの距離の6乗に反比例し、従ってこれらの効果の程度はプローブを隔てる距離を計算するのに使用することができる。FETは転移RNA分子の構造をさぐるのに(Beardsley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65:39, 1970)、並びにハイブリダイゼーションの検出に、制限酵素アッセーに、DNA巻き戻しアッセーに、及び他の応用において使用されている。

#### A. 分子内FET

FETは、本発明において、ドナー及びアクセプタープローブ間の距離が、異なるコンホメーション間で顕著に異なる場合、標的RNAのコンホメーションの変化をモニターするのに使用される。1つの実施態様において、内部ハイブリダイゼーションプローブ配列が例えば図3のように工作されたRNA分子が使用される。黒塗りの領域は、標的RNA配列を示し、斜線の領域は標的配列の大部分と相補的な内部プローブ配列を示す。コンホメーション1において、プローブ及び標的配列はハイブリダイズし、アクセプター(A)及びドナー(D)蛍光プローブは接近した近位となる。構成された標的配列のコンホメーションと結合するリガンドの存在下において、コンホメーション2が安定化され、結果として、プローブは離される。コンホメーション2の優位性は、相対的なドナー蛍光の増加及び/又はアクセプター蛍光の減少に反映される。

#### B. オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション及びFETの使用

同一鎖上のアクセプター及びドナー：この実施態様において、標的RNAは、重畳状態の時にRNAの5'-及び3'-末端が接近した近位にとどまりFETを起こすよう設計される。図4は、他のDNA又はRNAオリゴヌクレオチドとのハイブリッドの形成が、ドナー及びアクセプター間のより長い距離によりFET効率の減少をもたらすモデルを示す。

別の鎖上のアクセプター及びドナー：この手法は、RNAの設計が、同一鎖上にドナー及びアクセプター両方のフルオロフォアの組み込みを許容しない場合に有用である。この場合、ドナー及びアクセプターは別の鎖上にあり、標的：オリ

ゴヌクレオチドハイブリッドにおいて接近した近位となる(図5)。この実施態様において、ハイブリッドの形成はFETの増加をもたらす。

#### 5. コンホメーション特異的ヌクレアーゼを用いた高処理量アッセー

本発明の実施にあたり、標的RNAの重畳コンホメーションの、結合によるリガンド誘導安定化は、展開コンホメーションの標的RNAのフラクションを減少させる。逆に、リガンドの非存在下においては、そのような化合物の存在下に比べ、より多くのフラクションのRNAが展開状態で見いだされる。RNAの重畳コンホメーションは、RNA鎖間の塩基の対が起こっている二重らせん領域により特徴付けられる。S1及び大豆ヌクレアーゼ等の多くの核酸分解酵素は、二重

らせんRNAより一本鎖RNAのホスホジエステル結合を優先的に切断する。このような酵素は、本発明においてRNA標的分子のコンホメーションをさぐるのに使用することができる。

典型的なアッセーにおいて、標的RNA及びテスト化合物は結合が起こるようプレ保温される。続いて、適切なヌクレアーゼが添加され、混合物は適切な温度、ヌクレアーゼ濃度、イオン強度及び変性剤濃度等の条件下で保温され、短い保温期間内(典型的には30分間)で、使用されるヌクレアーゼの特性により(リガンドの非存在下で)約75%のRNAが切断されることが保証される。次に当該技術においてよく知られたいずれかの方法により切断の程度が測定され、遊離リボヌクレオチドリン酸とオリゴヌクレオチドとが区別される。この方法は、特に限定されないが、酸沈殿及び標識化RNAの検出、ドナー及びアクセプター蛍光プローブを含むRNAのFET、並びに電気泳動的分離及びオートラジオグラフィ、蛍光、UV吸収、標識化核酸プローブとのハイブリダイゼーション又は色素結合によるRNAの検出を含む。

2つ以上のオルタナティブ重畳RNAコンホメーション間の変化もまたヌクレアーゼ切断を用いて検出することができる。この実施態様において、それぞれのコンホメーションは典型的にはいくつかの二重らせんRNAの領域を含む。オルタナティブコンホメーションが異なる量の二重らせん領域を含む場合、それらはヌクレアーゼ耐性材料の量を測定することにより区別することができる。これら

## の構造の全ての二重

らせん部分が比較される場合、異なる標的RNAコンホメーションのヌクレアーゼ切断により得られたヌクレアーゼ耐性フラグメントを区別することが必要である。図6は、2つのオルタネート標的RNAコンホメーションの一本鎖特異的ヌクレアーゼによる切断の、寸法及び含有配列において異なる安定な生成物をもたらす効果を説明する。例えば、領域B及びB'はコンホメーション1及び2の両方のヌクレアーゼ耐性フラグメント中に見いだされるが、領域Aはコンホメーション2の切断後には見いだされない。特異的RNAフラグメントは当該技術においてよく知られたいずれの方法を用いても検出及び定量することができる。前記方法としては、特に限定されないが、標的RNAの標識化、標的特異的プローブとのハイブリダイゼーション、標的特異的プライマー逆転写酵素を組み合わせたPCRを用いた増幅、及び切断生成物の寸法の決定（特異的RNAコンホメーションの切断生成物が、他のコンホメーションの切断生成物と区別しうる特徴的寸法を有している場合）が含まれる。

異なる核酸構造に特異的なヌクレアーゼもまた相補的オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの定量に使用することができる。

RNAアーゼH：RNAアーゼHは、DNA：RNAハイブリッドのRNA鎖を特異的に分解する、商業的に入手可能なヌクレアーゼである。5'一端又は3'一端ビオチニル化RNA標的は、他方の末端で放射核種又はフルオレセイン、ローダミン若しくはクマリン等のフルオロフォアによっても

標識化される。反応を通して形成されたRNA：DNAハイブリッドのRNAアーゼH切断は、（一端の）ビオチン部分と（他端の）フルオロフォア又は放射核種との物理的分離をもたらす（図7）。ハイブリッド形成に関係しないRNA標的鎖はRNAアーゼHによっては切断されず、上記のようにストレプトアビジンによる結合後に定量することができる。この実施態様において、テストリガンドが標的RNAに結合している場合は、得られたシグナルは増加するであろう。

ヌクレアーゼS1：商業的に入手可能なヌクレアーゼS1（Promega, Madison

、WI)を用いて、一本鎖核酸を特異的に切断することができる。この酵素は、DNAオリゴヌクレオチドがビオチン部分並びに標識を内部位置に担う場合、本発明において使用することができる(図8)。ハイブリッドを形成する標識化された鎖はS1ヌクレアーゼによる切断に耐え、上記のようなSAを介した捕捉により定量される。標識は、ハイブリッド形成に加わるRNAセクションにあってもよい。又は、標識がRNA標的内に位置しなければならない場合、RNAアーゼT1又はRNAアーゼONE(商標, Promega)等の一本鎖特異的RNAアーゼを用いて同様の手法を行うことができる。

#### 6. コンホメーション特異的結合

様々な材料が、RNA構造の一つ又は他の形に、より大きい親和性で結合する。この現象の第1の例は、ヒドロキシアパタイトである。ヒドロキシアパタイトは、一本鎖核酸より、二重らせんの方により大きな親和性を有している。対照的に、

ニトロセルロースは二重らせんRNAより一本鎖により高い親和性を有している。これら及び他の同様な材料は、特にリガンドの結合が、その一本鎖割合において他のコンホメーションと顕著に異なる一つのコンホメーションを安定化させる場合、RNAの異なるコンホメーションを区別するのに使用することができる。これらの方法は、リガンド結合が展開状態に比べて重畳RNAコンホメーションを安定化させるとき一般的に有用である。

RNAを認識する抗体もまた、本発明においてリガンドを識別するために高処理量モードにおいて使用することができる。有用な抗体は、特定のRNA配列(及び/又はこのような配列のコンホメーション)を認識しうる(Deutscher et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:3299,1988)か、配列独立的な態様で二重らせん又は一本鎖RNAと結合することができる(Schonborn et al., Nuc.Acids Res. 19:2993,1991)か、又はDNA:RNAハイブリッドと特異的に結合することができる(Stumph et al., Biochem. 17:5791, 1978)。これらの実施態様において、抗体の標的RNAへの結合は、テストリガンドの存在下及び非存在下において測定される。

## 7. 生物物理学的測定

様々な生物物理学的測定を、RNA分子の重畳及び展開コンホメーションを調べ、そのようなコンホメーションの相対量を検出するために使用することができる。前記方法としては、特に限定されないが、UV吸収、CDスペクトラム、固有蛍光、外部の(extrinsic)共有結合的又は非共有結合的プ

ローブの蛍光、沈降速度、及び粘度が含まれる。これらの特性のそれぞれは、RNAコンホメーションの変化に伴い変化しうる。これらの実施態様において、測定は、テストリガンドの存在下及び非存在下において、標的RNA及び適切な緩衝液、塩及び変性剤の混合物について行われる。測定可能な特性の変化、特に展開から重畳へのRNAの形態の変換を示唆するものは、リガンド結合を示すものである。

## 8. コンホメーション安定性の変化

上に述べたいずれの構造の測定も、リガンド結合によるコンホメーションの安定化を調べるのに使用することができる。このようなコンホメーションの安定性は、そのコンホメーションとオルタナティブ（典型的には展開の）コンホメーションとの自由エネルギーの差として定義される。コンホメーションの安定性は、テストリガンド存在下又は非存在下で、又はある範囲の条件下にわたって、定常濃度下で測定することができる。例えば、上記の方法のいずれかで測定された、上昇した温度の構造への効果は、テストリガンドの存在下及び非存在下（コントロール）において測定することができる。構造が失われる温度の上昇は、リガンド結合を示す。

## 9. 隣接するRNAへの蛋白の結合の妨害

RNAの3次元構造に依存した態様で、特異的なRNA配列と結合する様々な蛋白が知られている。これらの実施態様において、蛋白の結合は、RNA構造及びリガンドの結合に際してのその変化のプロープとして使用される。標的RNA配列及び蛋白が結合するRNA配列が、同じRNA分子内に

組み込まれる。結合蛋白とその結合配列との相互作用は、テストリガンドの存在

下及び非存在下において測定される。リガンドにより誘導された、蛋白結合部位のコンホメーションを変化させるRNAコンホメーションの変化は、蛋白結合を測定することにより検出される。

### 応用

ある標的RNAの結合は、そのRNAの作用を直接修飾することを意図する薬剤の必須要件である。従って、本発明の方法の使用によりテストリガンドがある状態の病因を反映するかその病因に影響されるRNAに結合することが示された場合、それはテストリガンドの、RNA機能を変化させる、又は有効な薬剤又はそのような薬剤の開発のための導入化合物(lead compound)となる、潜在的な能力を示すものでありうる。また、リガンドは、RNAの機能を変化させるのに有力な追加成分を含むハイブリッド化合物の構成の基礎として使用されうる。この場合、リガンドの標的RNAへの結合は、追加成分を定着又は方向づけ、その薬剤学的効果をもたらすよう働く。本発明の方法が殆どのRNAに共通の物理化学的特性に基づいているという事実は、幅広い応用を与える。本発明は、何千ものテストリガンドの、コスト的に効果的なスクリーニングを許容する大規模な組織的高処理量手順に応用することができる。本発明の方法で一旦リガンドが識別されたら、それをさらに詳細に、使用された特定の標的RNAに特異的な知られた方法を使用してさらに分析することができる。例えば、リガンドは、例えば放射標識されたりリガンドと

標識されてない標的とを保温し、続いてRNA結合及び非結合リガンドを分離すること等により、標的RNAへの直接の結合についてテストすることができる。さらに、リガンドについて、それらの、標的RNAの知られた生物学的活性へポジティブに又はネガティブに影響を与える能力をテストすることができる。

本発明を応用することができるRNA標的の非限定的な例を、以下の表に示す

治療領域	RNA標的
抗ウイルス	HBVイプシロン配列; HCV 5' 非翻訳領域; HIV パッケージング配列、RRE、TAR; ピコルナウイルス内部翻訳エンハンサー
抗細菌	RNアーゼP、tRNA、rRNA (16S及び23S)、4.5S RNA
抗真菌	抗細菌と同様のRNA標的
慢性関節リウマチ	CD23のオルタナティブスプライシング
癌	転移的なふるまいが、オルタナティブスプライスされたCD44により与えられる; 癌原遺伝子をコードするmRNA
CNS	RNAの修正は、グルタミン酸受容体-Bを変化させ、カルシウムイオン透過性を変化させる
I型神経線維腫症	RNA修正は、NF1 GAP関連ドメインの5'末端に停止コドンを導入し、NF1を後生的に(epigenetically)不活性化する
心臓血管	RNA修正は、じゅく状硬化と強く関連するApoB-100の量に影響する

以下の実施例は、本発明を限定することなしにさらに説明することを意図している。

#### 実施例1：ゲルシフトアッセーを使用したRNA重畳の検出

##### A. 原理

図9(上)に示された、AB-RNAと名付けられたRN

A分子は、ATPと高い親和性で結合することが示された(Sassanfor et al., *Nature*, 364:550, 1993)。以下に記載される実験において、このRNAは本発明の異なる実施態様を説明するために使用された。

図9(下)に図示される通り、本発明の実施において、このRNA(AB-RNA)のATP及び競合オリゴヌクレオチドとの保温は、ATP:AB-RNA複合体並びにオリゴ:AB-RNAハイブリッドの形成を許容する。ATPの非存在下においては、ハイブリッドの形成が優先する。対照的に、ATPの存在下においては、安定なATP:RNA複合体の形成のために、ハイブリッドの形成は比較的優先しなくなる。従って、反応混合物中のオリゴヌクレオチド:RNAハイブリッドの量の測定は、RNA結合リガンドの存在又は非存在を示す。

##### B. 方法

AB-RNAは、テンプレートとして、T7-RNAポリメラーゼプロモータ

ー及びそれに続くAB-RNAをコードする領域の配列を含むDNAオリゴヌクレオチドRBS-87-8A (5' -GGAAC CTTGC CGGCA CCGAA GTGCC GCAGT TTCTT CCCAA GGTTC CTATA GTGAG TCGTA TTA-3') を使用して転写された。転写反応において [ $^{32}$ P] -UTPを含ませることにより、 [ $^{32}$ P] 標識AB-RNAを得た。オリゴヌクレオチドテンプレートを使用したT7 RNAポリメラーゼ転写反応のための条件は、Milligan e

t al., Nuc.Acids Res., 15:8783,1987に記載されている。

37.5 mM トリス pH 7.5、150 mM NaCl 及び 7.5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 360  $\mu$ l の混合物中の [ $^{32}$ P] 標識AB-RNA (およそ 30,000 cpm) を、90℃、2分間で熱変性させ、その後氷上で2分間冷却した。混合物を 120  $\mu$ l の3つの部分に分け、水 20  $\mu$ l、300  $\mu$ M ATP、又は 300  $\mu$ M UTP を加えた。これらの混合物のそれぞれからの 12  $\mu$ l の部分9つに、続いて様々な量の相補的RBS-87-8Aオリゴヌクレオチド及び水を加え、それぞれの最終量が 20  $\mu$ l になるようにした。得られた反応混合物は、0から 1.97  $\mu$ M の範囲の最終濃度のオリゴヌクレオチドを含み、かつ、30  $\mu$ M のATP、30  $\mu$ M のUTPのいずれか1つを含んでいたか又はリガンドなしであった。反応混合物には続いて 3  $\mu$ l の負荷用色素を加え、12% ポリアクリルアミドネイティブゲルに負荷した。ゲル及び泳動緩衝液は、37.5 mM トリス pH 7.5、150 mM NaCl、7.5 mM MgCl<sub>2</sub>、及び対応するリガンド濃度を添加した 1x TBE 緩衝液を含んでいた。

### C. 結果

ハイブリダイズされた、及びハイブリダイズされていないRNAのゲル電気泳動による分離は、AB-RNAのRNA:DNAハイブリッドへの50%の変換にはリガンド非存在下でおよそ 24 nM のRBS-87-8Aオリゴヌクレオチドが必要であり、100%の変換には少なくとも 72.9 nM のオリゴヌクレオチドが必要であることを示した (図10、



上図)。対照的に、 $30\text{ }\mu\text{M}$  ATPの存在下では、同様の量のハイブリッド形成を引き起こすのに $656\text{ nM}$ から $1970\text{ nM}$  RBS-87-8Aオリゴヌクレオチド濃度が必要であった(図10中図)。この効果は、ATPとオリゴヌクレオチドの、AB-RNAへの結合についての競合の結果である。さらに、この実験はUTPはオリゴヌクレオチドと競合できないことを示した。これは、観察された効果はリガンド特異的であることを示している(図10下図)。

#### 実施例2：ストレプトアビジン被覆常磁性ビーズを使用したRNAリガンドの処理量検出

##### A. 方法

上記実施例1で述べた $[^{32}\text{P}]$ -標識ATP結合RNA(AB-RNA)を、結合緩衝液( $50\text{ mM}$  トリス pH 7.5、 $200\text{ mM}$  NaCl、及び $10\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ )中で $90^\circ\text{C}$ で2分間熱変性させ、氷上で2分間冷却した。熱変性させたAB-RNAの $37.5\text{ }\mu\text{l}$ の部分、続いて $12.5\text{ pmol}$ の5'-ビオチニル化オリゴヌクレオチドRBS-96-60(上記実施例1に記載したRBS-87-8Aと同一のヌクレオチド配列を有する)及び様々な量のATP又はUTPを含む $12.5\text{ }\mu\text{l}$ の溶液と混合した。室温での短い保温の後、混合物をストレプトアビジンで被覆した $0.5\text{ mg}$ の常磁性ビーズ(PMP-SA)(Promege, Madison, WI)を含む96ウェルプレートに移した。プレートを室温で15分間保温し、結合させた。強力な磁石をプレートの下に置き、その後PMP-SAビーズを $50\text{ }\mu\text{l}$ の結合緩衝液で洗

浄した。ビーズに結合した $[^{32}\text{P}]$ -標識ABRNAを続いてマイクロベッタ(Microbeta)LS Cカウンター(Wallac)でチェレンコフ計数することにより定量した。

##### B. 結果

図11はビオチニル化オリゴヌクレオチド(RBS-96-60)と標的RNA(AB-RNA)との間に形成されたハイブリッドを反映する、通増する濃度のATP又はUTPの存在下におけるPMP-SAビーズに結合した $[^{32}\text{P}]$ -AB-RNAの量を示す。結果は、形成されるハイブリッドの量は $25\text{ }\mu\text{M}$ 程の

少量のATPを添加することにより50%減少させることができることを示している。期待された通り、UTPがリガンドとして使用された際には何の効果も見られなかった。

### 実施例3：ニトロセルロースフィルター結合を使用したRNAリガンドの高処理量検出

#### A. 原理

本発明のこの実施態様は、多くの蛋白はニトロセルロースフィルターを強固に吸着するという事実を利用している。ビオチニル化オリゴヌクレオチド及び標識化標的RNAが使用される場合（上記実施例2に示されるように）、自由ストレプトアビジン（SA）又はSA誘導体が反応系に添加され、オリゴヌクレオチドのビオチン部分への結合が許容され、その後反応系は96ウェルニトロセルロースフィルタープレートに通されて濾過される。この方法で、ビオチニル化オリゴヌクレオチドとハイブリダイズされた標識化標的RNAは

フィルターに保持され、一方ハイブリダイズされないRNAは失われる。

#### B. 方法

標的RNAは、上記実施例1に記載されたように $^{32}\text{P}$ で標識化されたHIV Rev蛋白（Rev応答要素（Rev Responsive Element, RRE）；5' -GAAUA CUAUG GCGGC AGCGU CAAUG ACGCU GACGG UACAG GCCAG ACAAU UAUUG UCUGG UAUAG U-3'）への結合部位を含むRNA分子であった。RBS-79-91b-Bと名付けられたビオチニル化オリゴヌクレオチドは、RRE標的RNAの位置5から28と相補的であり、5' -ビオチン-CGTCA TTGAC GCTGC GCCCA TAGTG C-3'の配列を有している。50mMトリスpH7.5及び50mM NaClを含む40 $\mu\text{l}$ の緩衝液中で、0.1p molの $[\text{}^{32}\text{P}]$ -RRERNAを5p molのRBS-79-91b-Bと保温した。室温で15分間後、様々な量のストレプトアビジン単独（SA）、 $\beta$ -ガラクトシダーゼと連結したストレプトアビジン（SA:BG）、又はアルカリホスファターゼと連結したストレプトアビジン（SA:AP）を混合物に添加し

、20分間結合させ、その後ミリポア(Millipore)HATFニトロセルロースフィルタープレートを通して濾過した。濾過物を400 $\mu$ lの同じ緩衝液でさらに洗浄し、フィルターに残ったRRE量を液体シンチレーション計測で決定した。

### C. 結果

図12は、SA連結蛋白が、標識RNA：オリゴヌクレオチドハイブリッドの保持の効率を増加させることを示している。RRE特異的リガンドが反応系に含まれている場合、フィルターに結合した標識RRE RNA結合の相対量は減少する。

#### 実施例4：ニトロセルロースフィルター結合アッセーの特徴付け

上記実施例3に記載された高処理量アッセーについての様々な実験的パラメーターの効果を決定するために以下の実験を行った。

まず、20 pMol/ $\mu$ g蛋白の自由デオチン結合活性を有する2 $\mu$ gのSAAPが、ハイブリッドの、NCフィルターへの定量的保持を保証するのに十分であることが決定された。

続いて、典型的にはRNA標的に対し2倍モル過剰のオリゴヌクレオチドが、実質的なハイブリッド形成を達成するのに十分であることが決定された。100 nM放射標識化AB-RNA、50 mMトリスpH7.5、200 mM NaCl、及び10 mM MgCl<sub>2</sub>を含む、30分SCAN反応におけるデオチニル化オリゴヌクレオチド67Bの滴定が、図13Aに示される。500 nMを超える濃度のオリゴヌクレオチドの添加は、段階的な保持の損失をもたらした。このことからSAAPの能力が飽和したことが示唆される。最小量のオリゴヌクレオチドが使用できることは、定量的NCーフ

ィルター保持に必要とされるSAAPの量を減らし、従ってアッセーのコストを低減する。

図13Bは、250 nMのオリゴヌクレオチドを含む反応の時間経過を示す。結果は、この量のオリゴヌクレオチド(RNAに対し2.5倍モル過剰)は、SCAN反応が完結した場合であっても、フィルターへのハイブリッドの定量的保

持を仲介するのに十分であることを示している。

図13Cは、非特異的競合物として通増する濃度の酵母tRNAが添加された場合における10分のSCAN反応を示す。結果は、100倍モル過剰の酵母tRNAであっても、ニトロセルロースフィルターへのハイブリッドの保持に影響しないことを示す。大過剰の非特異的RNA競合体のSCANアッセーへの添加は、非特異的に核酸と相互作用するリガンドによって起こる、望まれない陽性のスクリーニング結果の発生率を減少させると期待される。

図13Dは、同一条件における(MgCl<sub>2</sub>非存在下においての)NaClの効果の説明する。期待されたとおり、ハイブリッドの形成は、NaClの添加によって刺激された。興味深いことに、10mMのMgCl<sub>2</sub>存在下においては、効率的な保持を得るためにNaClは必要とされなかった。従って、ハイブリダイゼーション率はイオン強度への依存性を示す。追加の実験は、イオン強度依存性は、使用されるRNA標的及びオリゴヌクレオチドによって変動することを示した。

HIV RRE及びTAR要素を含む他のRNA標的を用

いたSCAN反応においても同様の結果が得られた。イオン強度、オリゴヌクレオチドの濃度及び設計、並びに標的RNA濃度等のパラメーターを変化させることにより、高処理量スクリーニングに適した時間内での適切なハイブリッド形成の程度を達成するためにハイブリダイゼーションの動力学、即ち、室温において、10-100nM RNA標的及び標的RNAに対し2-4倍モル過剰のデオキシ化オリゴヌクレオチドを含む反応系における0.5-2時間の反応での30-50%の保持を調節することが可能であった。

#### 実施例5：SCAN反応における使用のためのオリゴヌクレオチドの設計のためのパラメーター

下記に記載される実験は、高処理量SCAN反応に置ける使用のための最適なオリゴヌクレオチド構造を識別するために行われた。RNA標的は、Rev蛋白への高親和性結合部位を含むHIV Rev応答要素(RRE)の、放射標識されたフラグメントである。RNA標的の9-12位を含む領域(図14C参照)

が展開している可能性がより高く、従って、オリゴヌクレオチド結合のための好ましい進入部位（核酸化部位）を提供できると考えられた。従って、この領域と全体的な又は部分的な相補性を有する様々なオリゴヌクレオチドが、反応においてテストされた。

ハイブリッドにおけるビオチン部分の接近のしやすさによる差異を避けるために、一連に使用された全てのオリゴヌクレオチドは同一の5' - ビオチニル化末端を有し、一方それらの3' - 末端は長さが様々であった。それぞれのオリゴヌ

クレオチドの全長は、対応するRNA標的の領域に相補的であった（図14Cで大文字で示される）。全ての反応で使用されたRNA標的の全長は、図6Cの左端に示され、一方オリゴヌクレオチド92A、99A、92B及び92Cに相補的なRNAの領域は部分構造上に示される。

100 nM放射標識RNA標的及び250 nMオリゴヌクレオチド（図14A）又は25 nM放射標識RNA標的及び50 nMオリゴヌクレオチド（図14B）を含む時間経過反応は、ハイブリッド形成における劇的な差異の証拠を示した。オリゴヌクレオチド91B、99A及び92Aを含む反応の比較は、期待に反し、より長いオリゴヌクレオチドが必ずしもより速い動力学を示すのに必要とはされないことを示した。そのかわり、結果は、オリゴヌクレオチドの3' 末端の位置決め及び領域9-12内の相補的塩基の数の両方が、ハイブリッド形成速度の決定に支配的な役割を果たすことを示した。最も劇的であったのは、3' 末端で1塩基だけ長さが異なるオリゴヌクレオチド92A、99A及び92Bの間の差異である。

これらの所見は、領域9-12が核酸化部位として働くことと辻褄が合い、ハイブリッド形成の動力学は、オリゴヌクレオチド及び核酸化部位間に形成しうる塩基対の数に大きく依存することを示唆する。結果はさらに、オリゴヌクレオチドの3' 末端から始まる核酸化は、内部オリゴヌクレオチド部位より好ましいことを示唆する（91B及び92Aを比較）。この解釈を支持する同様の結果は、HIV TAR RNA

を含む他のRNA標的を使用したSCAN反応においても観察されている。

SCAN反応における速度限定因子の知識は、オリゴヌクレオチドの設計をガイドするのに重要である。上記の結果は、主要な速度限定因子は、ヘアピンループ、バルジ、内部ループ及び他の領域を含む、標的RNA上の核酸化部位との、オリゴヌクレオチドの最初の相互作用であることを示唆する。ループ及びバルジは多くのRNA結合蛋白の好ましい認識部位であり、偽ノット(pseudoknots)等の3次RNA-RNA相互作用にも含まれるので、SCANアッセイのこの特性は利点として使用できる。このようなRNA-蛋白及びRNA-RNA相互作用は、多くのRNA構造の調節機能にとって重要である。従って、オリゴヌクレオチドの注意深い選択により、SCANアッセイはこれらの領域と相互作用するリガンドに対し非常に感受性の高いものとなりうる。さらに、より大きなマルチドメインRNA構造において、RNAの異なるサブドメインを標的とするために異なるオリゴヌクレオチドを使用することができる。

#### 実施例6：特異的RNA-結合リガンドの識別

100 nM放射標識AB-RNA及び250 nMビオチニル化オリゴヌクレオチド67Bを含むSCAN反応系を、テストリガンドとして遞増する量のATP又はUTPと保温した。

テストリガンドの非存在下で、70%のAB-RNAをNCフィルターに保持した。NCフィルター上のRNA保持の

阻害(%阻害)を、 $(1 - (R/R_0) \times 100)$ として得た。ここで $R_0$ はテストリガンドなしでの保持であり、 $R$ はテストリガンドありでの保持である。5 mM ATPは保持を50%阻害した一方、500 mM UTPが同一の効果を示すのに必要であった。即ち100倍の特異性因子を示した(図15)。

同様に、RREリガンドST36723、ST46172及びST51378の添加は、NCフィルター上のRRE保持を2.5-15  $\mu$ Mで50%阻害した(図16)。これらのリガンドは、別々の実験において、RREと特異的に相互作用すること及び低 $\mu$ モル濃度においてRev-RRE相互作用を阻害することが示されている。

ATP及び他のNTPに対するAB-RNA含有SCANアッセーの異なる応答は、アッセーの特異性を反映している。この選択性を確認するために、知られたRNAリガンドを、異種(heterologous)RNA標的を用いてSCAN反応でテストした。図17に示される通り、ATPはRREに基づくSCAN反応において何の効果も示さなかった(中黒の四角)。反対に、RREリガンドST36723は、AB-RNASCAN系に何の影響も与えなかった(白抜き四角)。

#### 実施例7：高処理量スクリーニング方法の最適化

上に述べた高処理量スクリーニング反応における異なる溶媒及び試薬の効果をテストした。DMSOは、アッセープレートへの化合物の分配のための溶媒として典型的に使用される。本発明の実施にあたり、DMSOは典型的に5% (v/v)

の濃度で存在する。メタノール及びエタノールもまた、天然産物を含むいくつかの化合物コレクションの溶媒として使用される。還元性の環境を提供し、いくつかの化合物の望ましくない反応性を防ぐために、ジチオスレイトールを添加することができる。

50mM トリス pH 7.5、200mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、100nM AB-RNA、1 $\mu$ M 酵母 tRNA 及び 250nM オリゴヌクレオチド 67B を含む反応系について、様々な濃度の試薬の存在下において実施した。反応系への逡増する量のDMSOの添加は、ハイブリッド形成の減少をもたらした(図18A、中黒の円)が、反応は特異的リガンドの添加に対し感受性を保った(図18A、白抜きの円)。さらに、図18Aに示された通りの、5 $\mu$ M ATPによる、様々なDMSO濃度において得られた阻害の程度は、DMSOによっては顕著には影響されなかった(図18B)。

図18C及び18Dは、SCAN反応は様々な濃度のDTT、メタノール又はエタノールによっては影響されないことを示す。RREをRNA標的として使用し、同様の結果が得られた。

これらの結果は、SCAN反応は、高処理量スクリーニング手順において通常使用される溶媒及び試薬に対し良好な耐久性を有することを示す。

SCANアッセーは、自動装置及び室温条件を含む高処理量フォーマットと十

分互換性がある。試薬の送達及び濾過は、

マルチスクリーン真空多岐管(Millipore, Bedford, MA)を備えた96ウェルフォーマットの自動ピペッター(Wallac Oy, Turku, FinlandのQuadra-96)で行われ、シンチレーション計測は96ウェルフォーマットのマイクロベータシンチレーションカウンター(Wallac Oy, Turku, Finland)内において、96ウェルニトロセルロースフィルタープレート(Millipore, Bedford, MA)上で直接行われる。反応条件及び他のパラメーターは、反応時間を0.5から2時間内に保つために最適化されている。この手順の設計は、一人の科学者が週あたり8,000にのぼる化合物をスクリーニングすることを許容する。

図19は、リガンド非存在下において5%DMSOを含む475 RRE SCAN反応から得られた試料データを示す。アッセーは再現性が非常に高く、平均阻害はリガンド非存在下において $0 \pm 8\%$ の間であった。標準スクリーニング化合物濃度が $20 \mu\text{M}$ の場合、「ヒット」したものは、ハイブリッド形成を50%阻害することが期待され、上記のバックグラウンドの「ノイズ」レベルから明確に区別しうるであろう。

#### 実施例8：平衡条件下のSCANアッセー

オリゴヌクレオチド及びリガンドが標的RNAと平衡に達する、即ちRNA：リガンド及びRNA：オリゴヌクレオチド複合体の存在量がそれらの相対的解離定数に依存する、スクリーニングアッセーを示すため下記の実験を行った。この形態を有するスクリーニングアッセーは、アッセーの様々な

段階における時間の制約を除く利点を有する。さらに、リガンド結合と関連した熱力学パラメーターをアッセーの結果からより容易に導くことができる。

様々な長さの一連のオリゴヌクレオチド及びAB RNAを含む標的部位を用いて、ATPと十分に平衡する一群のオリゴヌクレオチドが識別されている(図20上図に一例が示される)。使用されたオリゴヌクレオチドは太文字で示された配列と相補的である(図20、上図)。

100 nM AB RNA及び500 nM オリゴヌクレオチドを含む溶液を2



時間 25℃で保温し、標的RNA：オリゴヌクレオチド複合体をプレ形成させた。反応系を100  $\mu$ M ATP存在下又は非存在下で5倍に希釈することにより（最終濃度はAB RNA 20 nM；オリゴヌクレオチド100 nM；ATP 100  $\mu$ Mとなった）解離を開始させた。ハイブリッドのニトロセルロースフィルターへの結合を、上記の通り行った。

結果（オリゴ：RNA複合体の%で示される）は、動力学アッセーを用いた場合（即ち非平衡条件下）に見られたものに比べて、ATPによるおよそ60%の阻害が見られたことを示す。

#### 実施例9：リガンド結合は、RNAのコンホメーション変化を誘発する

下記に記載される実験は、リガンド結合に際してのRNA構造の安定化をモニターするために行われた。この実験において、試料の温度の上昇に従っての260 nMにおける吸光

がモニターされた。温度の上昇はRNAを展開させ、それにより個々の塩基がより多く紫外光を吸収するようになる。

温度の変化に対する第1の吸光の誘導として、結果を図示的に示す（図21）。データは、40℃を中心とし、ATP存在下でのみ起こる新しい明白な変異を示している。これらの結果は、ATPリガンドがRNA構造を安定化させることを示している。

#### 実施例10：蛍光エネルギー転移を用いたRNAリガンドの高処理量検出

蛍光エネルギー転移（FET）は、蛍光ドナー及びアクセプター分子の対の存在に基づく。ドナープローブによる蛍光放出は、ドナープローブに接近した近位のアクセプタープローブに直接転移される。従って、プローブが十分接近している場合、ドナープローブの励起の際、ドナーが単独であるのに比べ、ドナー放出の減少及びアクセプター放出の増加が観察される。エネルギー転移の効率率はドナー及びアクセプタープローブの距離の6乗に反比例し、従って、これらの効果の程度はプローブを隔てている距離を計算するのに使用できる。分子内FETは、転移RNA分子の構造をさぐるのに使用されている（Beardsley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65:39, 1970）。本発明において、FETは標的RNAコンホ

メーションの変化をモニターするのに使用される。ただ1つの要件は、ドナー及びアクセプタープローブの間の距離が、異なるコンホメーション間で顕著に異なっていないなければならないということである。

A. FETが使用される本発明のいくつかの実施態様が下記に述べられる。

1) 図22は、比較的単純なABCステムループRNA構造を示す。相補的配列B' A' 及びC' B' を含む合成RNA標的が調製される(図23)。この合成基質はまた、フルオレセイン(F)及びローダミン(R)でそれぞれ5' 及び3' 末端において二重に標識される。このRNAは2つのとりうる構造をとることができる(図23左及び右)。これらの構造のうち1つは、蛍光色素をFETに適した接近した近位に位置させる。

RNAは、F及びR間の距離(図23、右)が最小となるよう設計される。このことは2つの構造間の、最大のFETの差異を確実にし、相補的DNAオリゴヌクレオチドが図23左の構造において適切なF-R距離を維持する必要があるようにする。

2) 図24は、重畳(左)及び展開(右)形態の、同様のABCステムループ構造を示す。オルタナティブ構造が無いことにより、ステムループ構造は、ステムループがリガンドの結合により安定化された際にFETの差異が検出できるよう本質的に不安定でなければならなくなる。

3) 図25は、複数の別個の標的構造(X、Y及びZ)を含む標的RNA分子を示す。この場合、比較的長いDNAオリゴヌクレオチドの使用は、重畳RNA及びハイブリッド間のFET差異を増加させるであろう。

また、図26に示されるような「捕捉測定」方法を使用す

ることもできる。この実施態様において、標的RNAはラジオアイソトープ又はフルオロフォアで標識化され、DNAオリゴヌクレオチドはビオチニル化される。ハイブリッドの量は、SPAと関連してストレプトアビジン被覆ビーズで捕捉されることにより又は上に述べたSAに基づく方法のいずれかにより測定される。

部分的ハイブリッドの形成によりおこりうる問題を避けるために、それぞれの標的部位に向けられた複数の別個のDNA鎖を使用することができる。この実施態様において、RNAはビオチンタグを運び、一方それぞれのDNA鎖はフルオレセイン (F)、テキサスレッド (R) 及びP<sup>32</sup> (P) 等の異なる標識で標識化することができる (図27)。このようにして、異なる方法によりそれぞれの一つを測定することにより、同一のRNA分子中の複数の標的を同時にテストすることができる。

B. 実験結果: 3'-フルオレセイン標識化AB-RNA (AB-RNA-F) 及び5'-ローダミン標識化オリゴヌクレオチド間のFETに基づくSCANアッセーを測定する際に、コントロール実験において、蛍光標識を全く有しないオリゴヌクレオチドの添加に際して発生する、535 nmにおけるフルオレセイン蛍光の実質的な増加が、予想に反して観察された (図28A)。50 mM トリス pH 7.5、200 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、及び60 nM AB-RNA-Fを含む反応系を、サイトフルオアII (CytoFluor II) 蛍光マルチウェルプレートリーダー (PerSeptive Bi

osystems, Framingham, MA) 中で、535 nm 放出 (485 nm 励起) において、オリゴヌクレオチド67B添加後の逡増する時間についてモニターした。

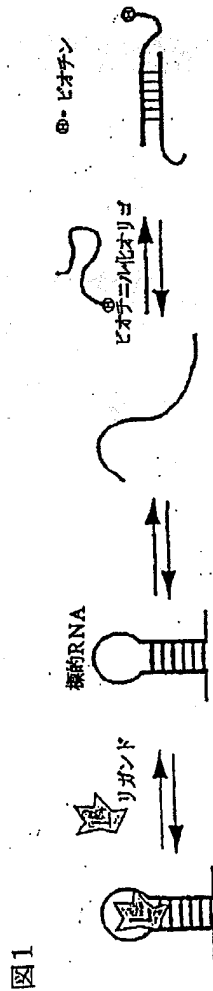
結果は、蛍光放出はフルオレセイン部分がAB-RNAの構造と関連した結果弱められたことを示唆した。フルオレセイン部分とRNAの関連による535 nmにおける蛍光放出の達成しうる最大の変化を見積もるために、AB-RNA-FのRNAアーゼA分解に従っての535 nmにおける放出を測定したところ、始めの値より最大2倍増加することが分かった。

蛍光分光光度計の高い再現性及び感受性のために、蛍光の2倍の増加は、感受性アッセーとして使用するためには十分なシグナルの変化より良く表す。従って、AB-RNA-F及び標識化されないオリゴヌクレオチド67Bを含むSCAN反応においてATP、GTP及びUTPの効果をテストした (図28B)。

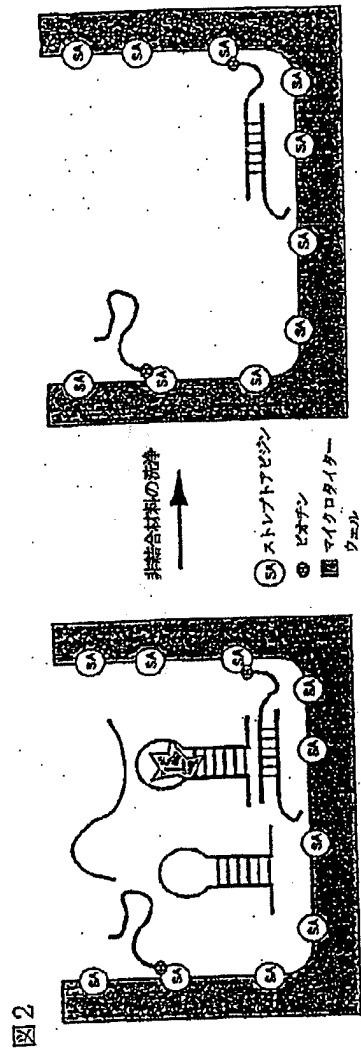
結果は、ATPの添加が添加リガンドの非存在下において観察される蛍光の増加を特異的に阻害することを示す。このアッセーにおけるATPのためのIC<sub>50</sub>

0 値 (5 mM) は、S A A P に基づく S C A N アッセーにより得られた値と同一であった。期待された通り U T P はずっと高い濃度において幾分かの効果をも有していた一方、G T P は全く何の効果も無かった。従って、これらのデータは、S C A N 反応におけるハイブリッド形成の測定のための、この手法の適切性を示す。

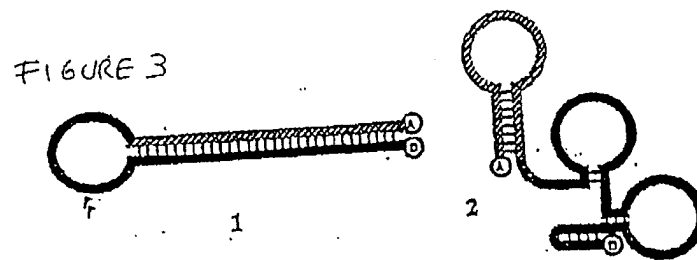
【図 1】



【図2】

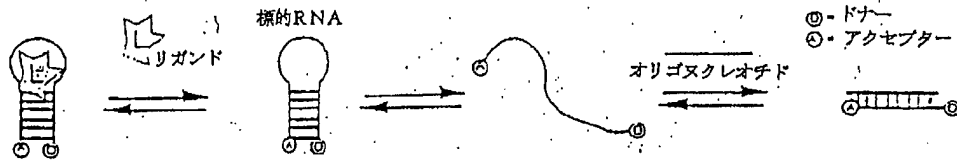


【図3】



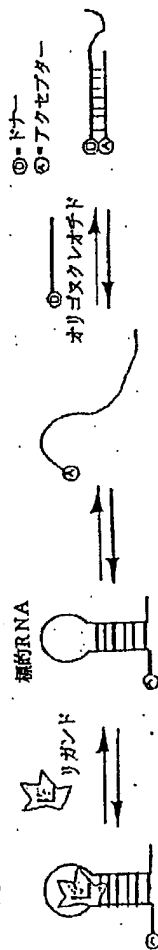
【図4】

図4



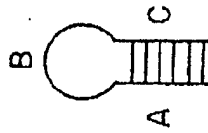
【図5】

図5



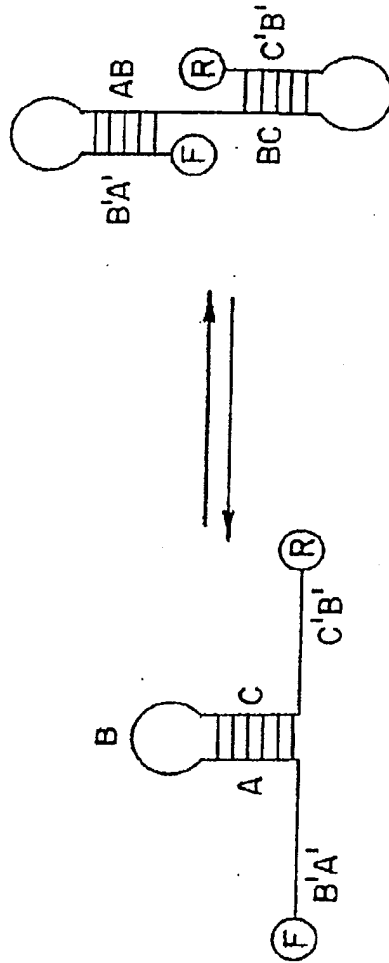
【图 22】

FIG. 22



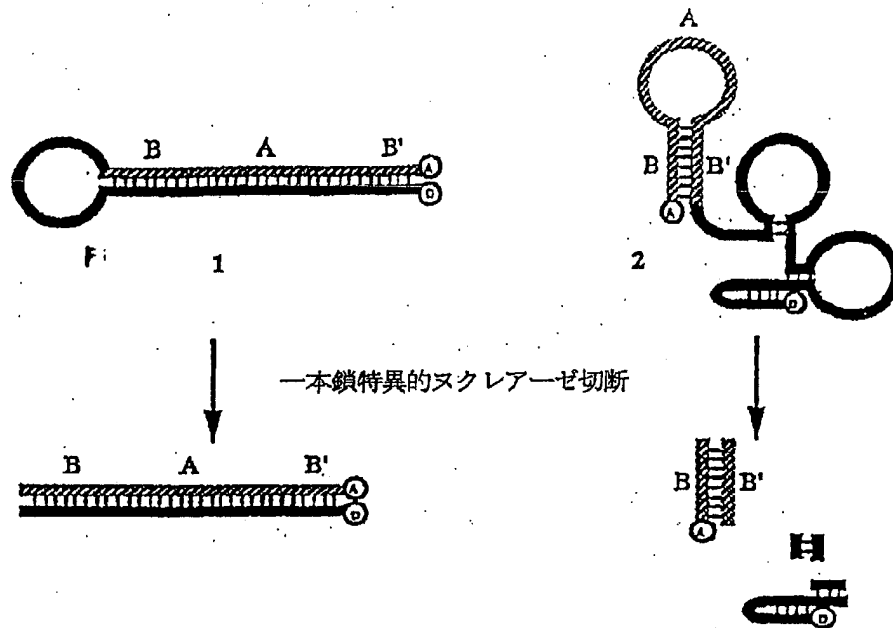
【图 23】

FIG. 23



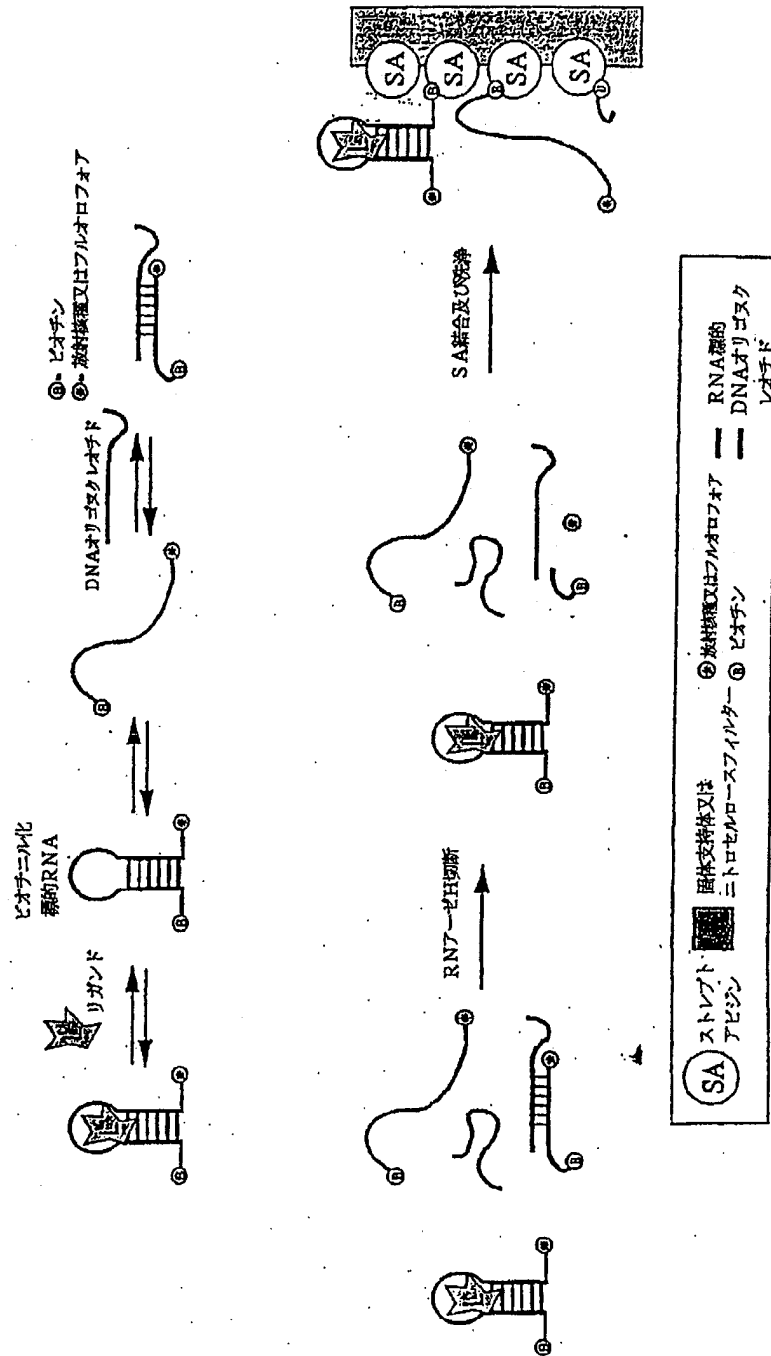
【図6】

図6





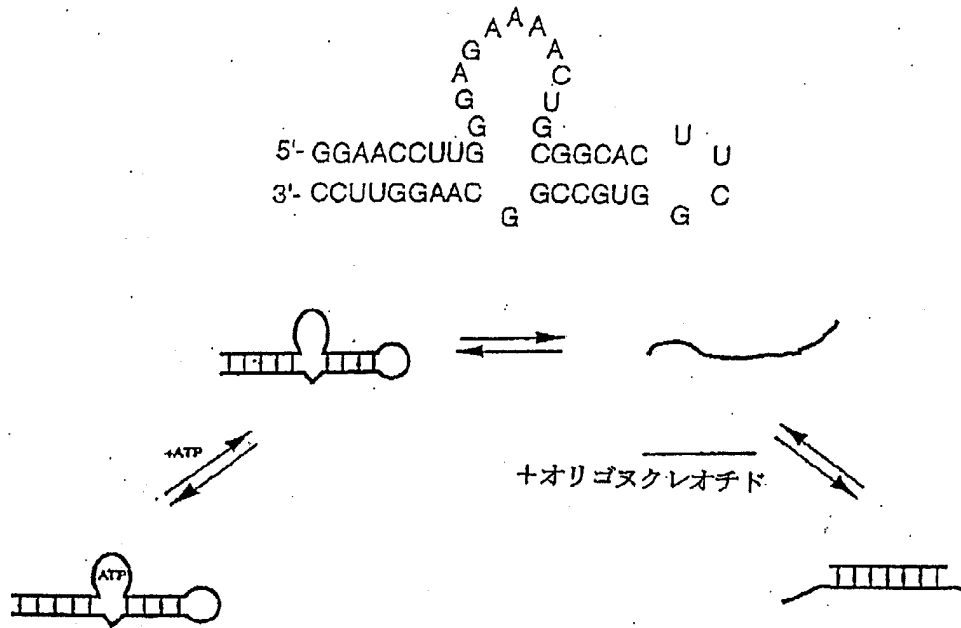
【図7】





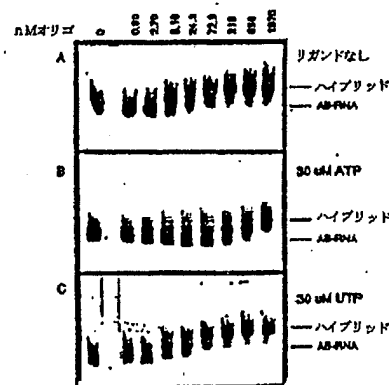
【図9】

図9



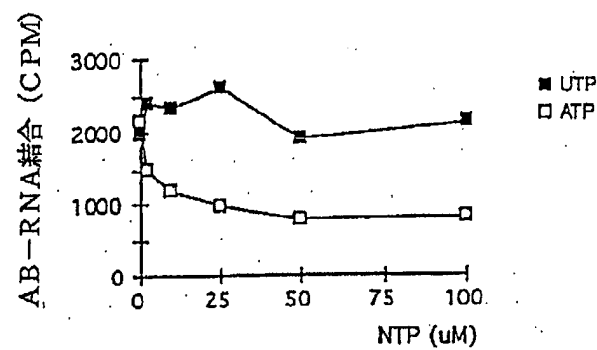
【図10】

図10



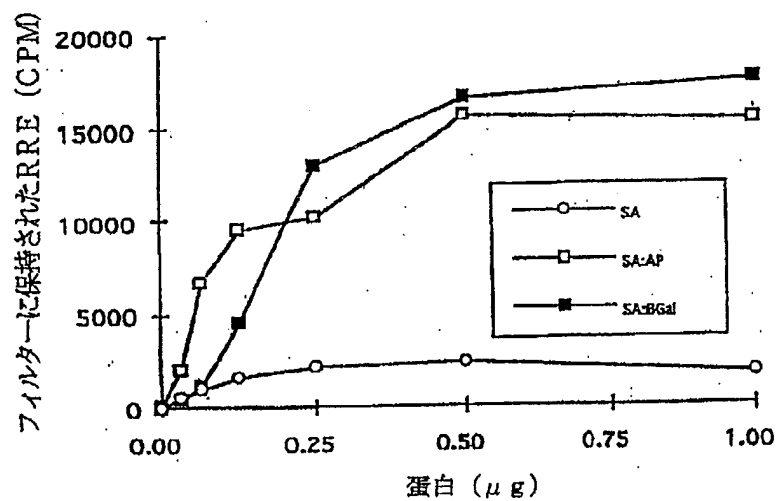
【図11】

図11



【図12】

図12



【図13】

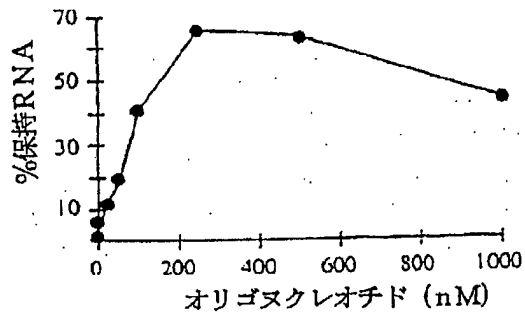


図13A

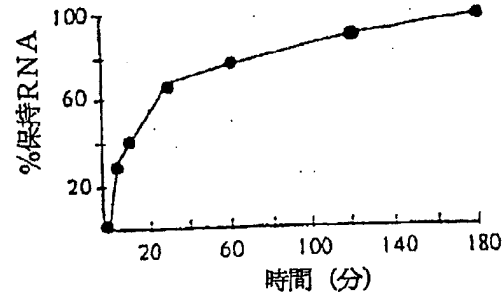


図13B

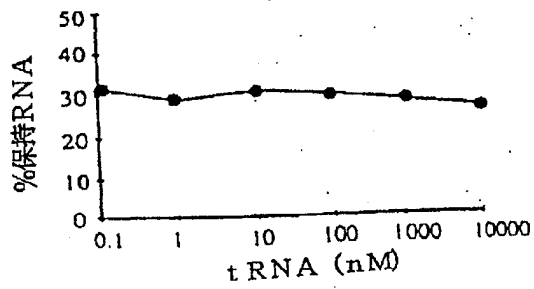


図13C

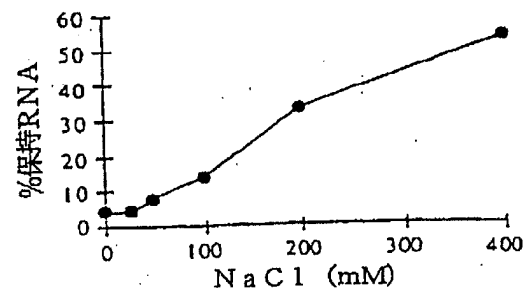


図13D

【圖14】

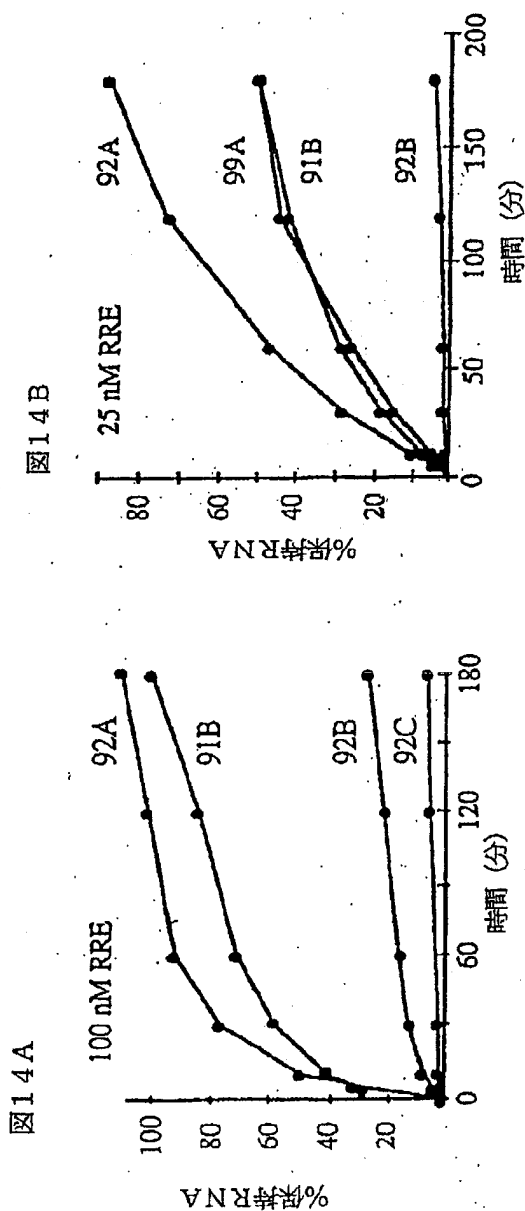
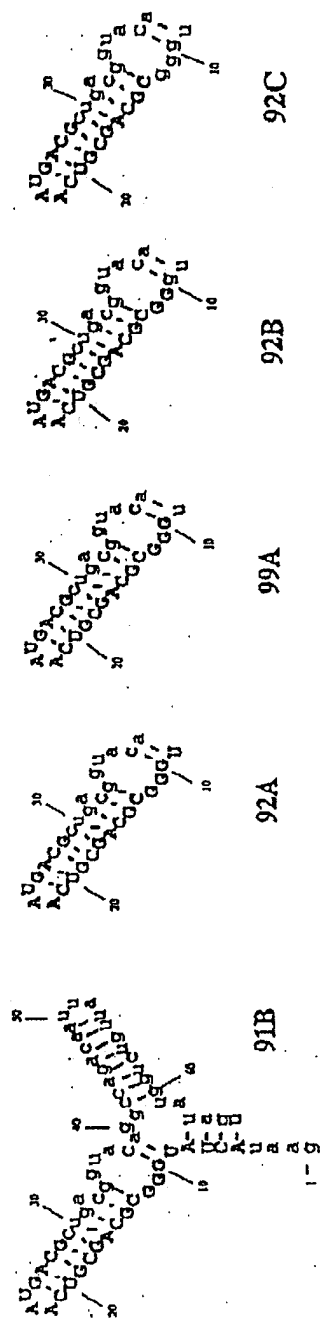
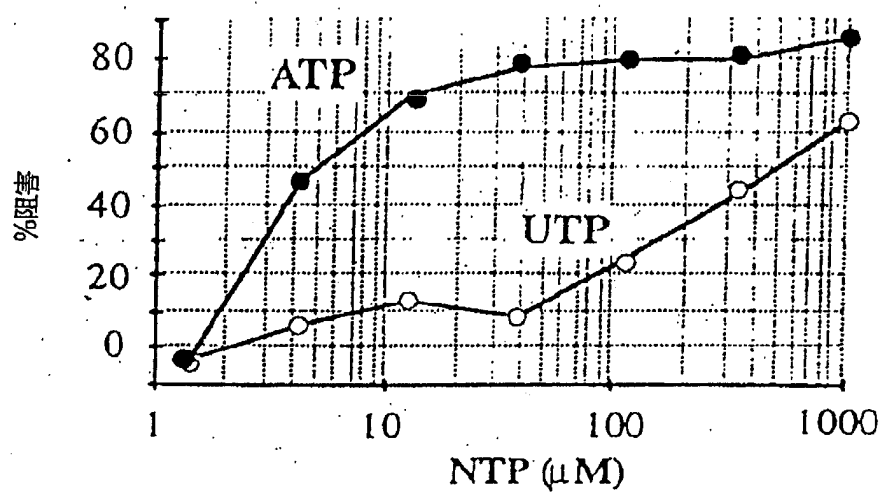


圖14C



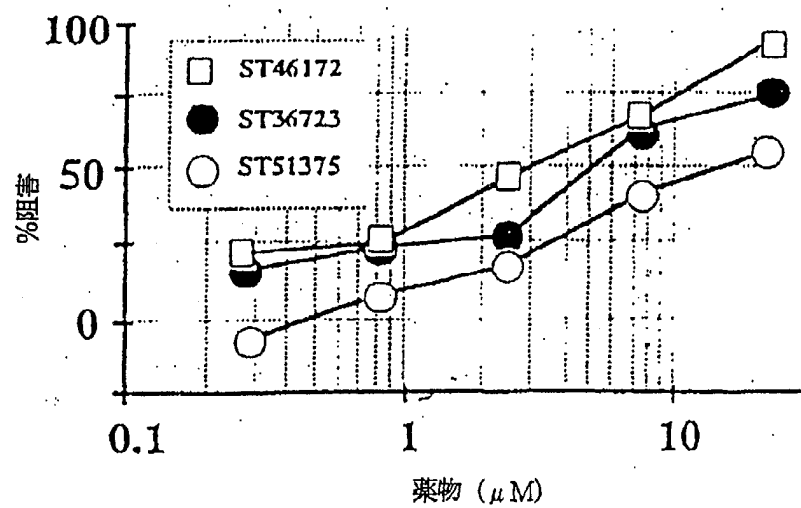
【図15】

図15



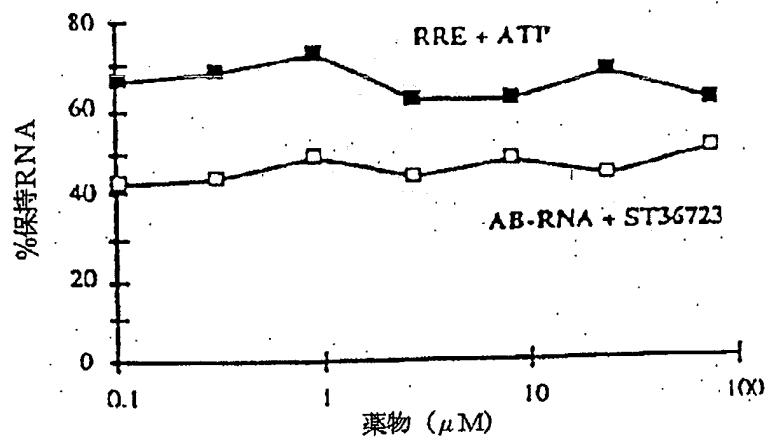
【図16】

図16



【図17】

図17



【図18】

図18A

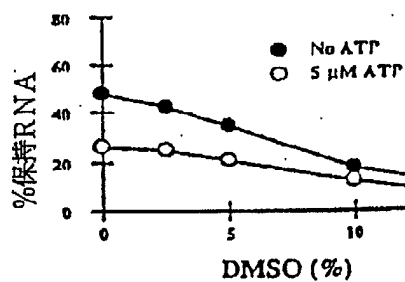


図18B

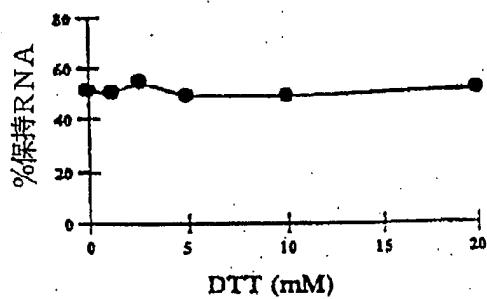
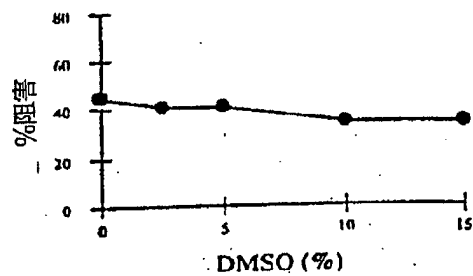


図18C

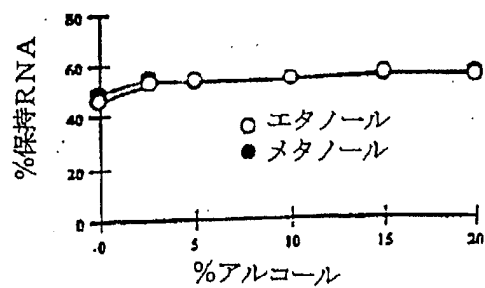


図18D



【图19】

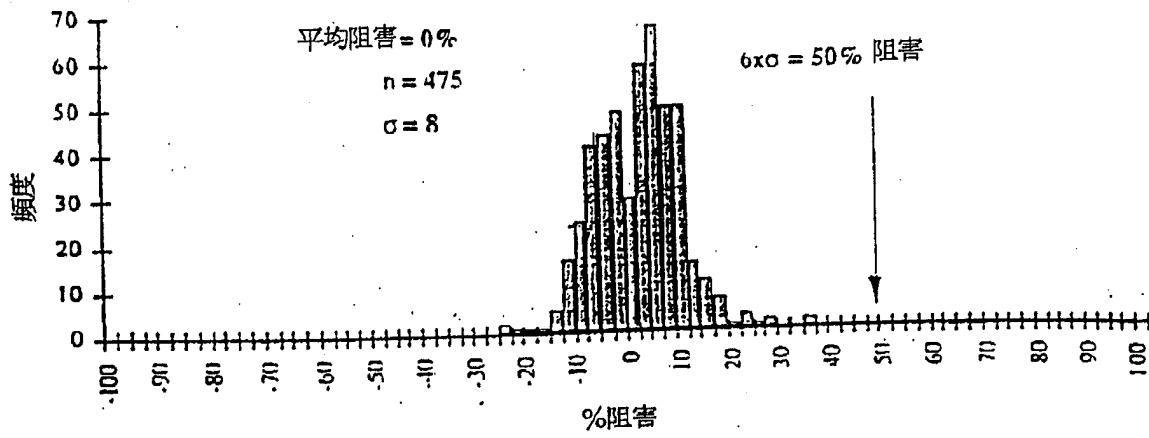
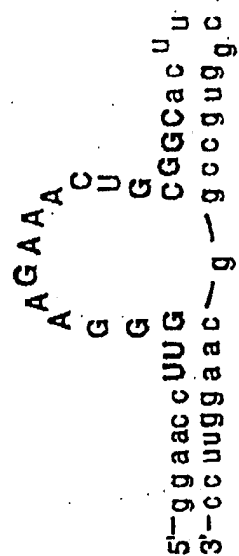


图19

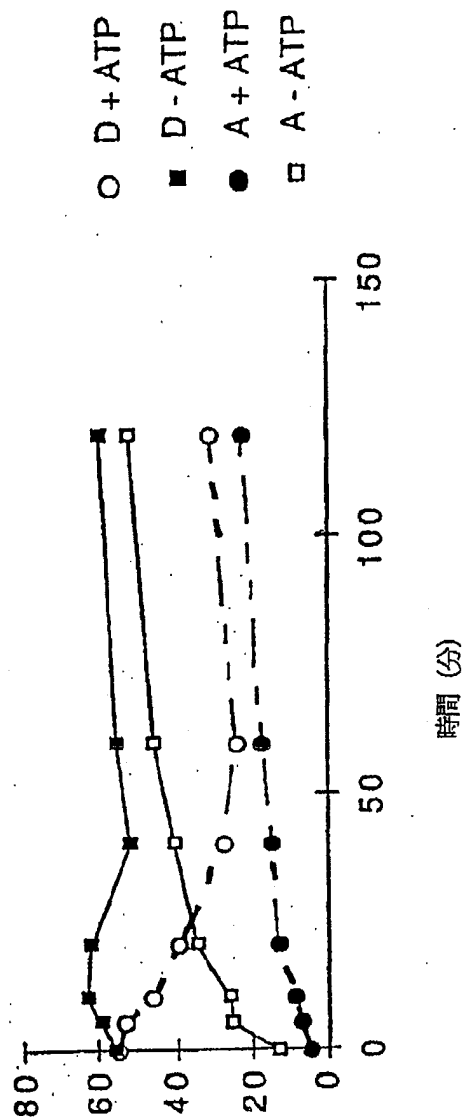
【圖 20】

圖20

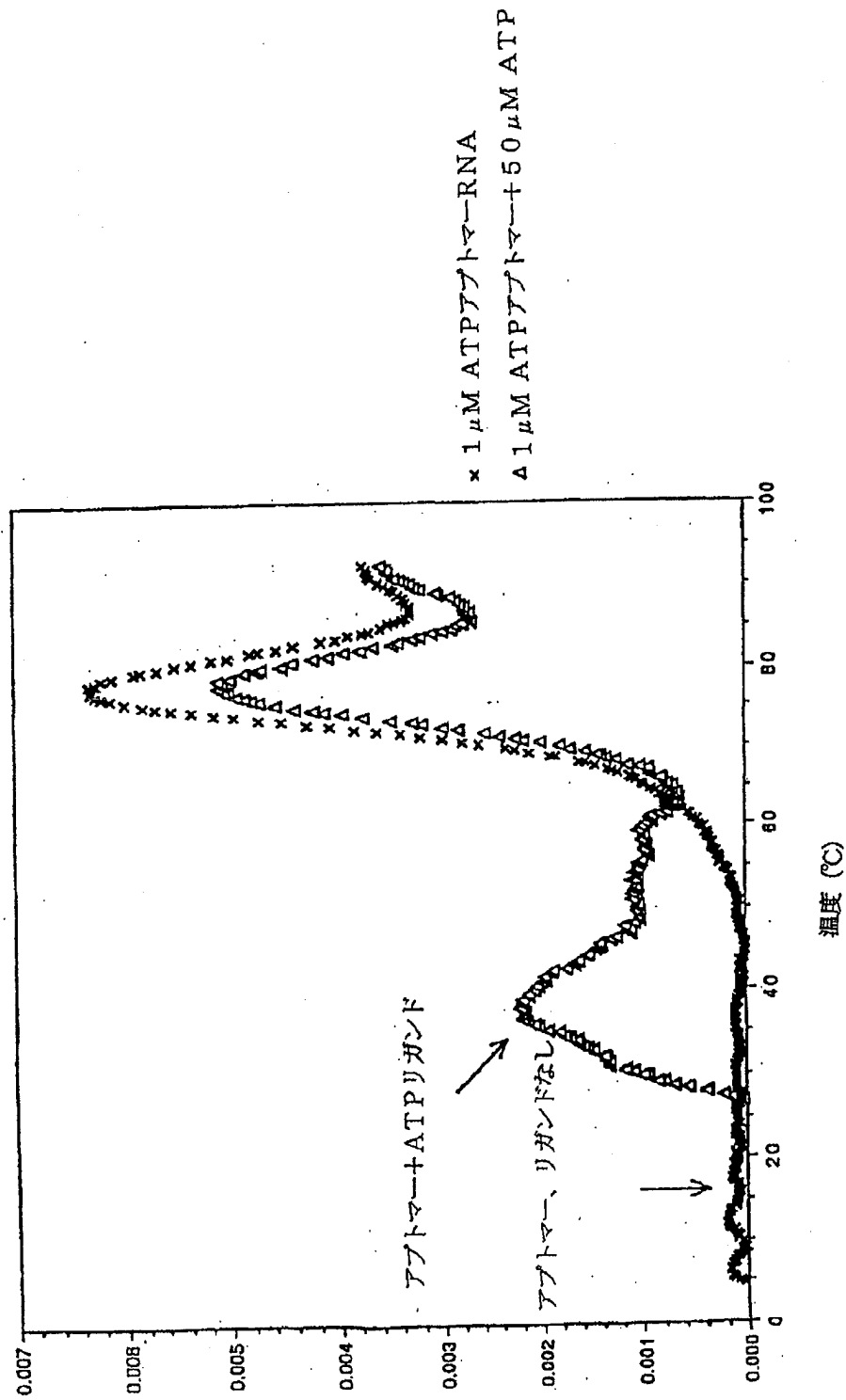


(57)

特表平10-509053



【図21】

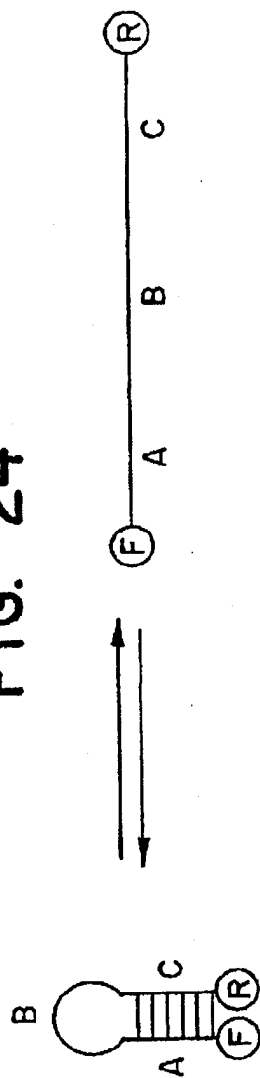


【图 24】

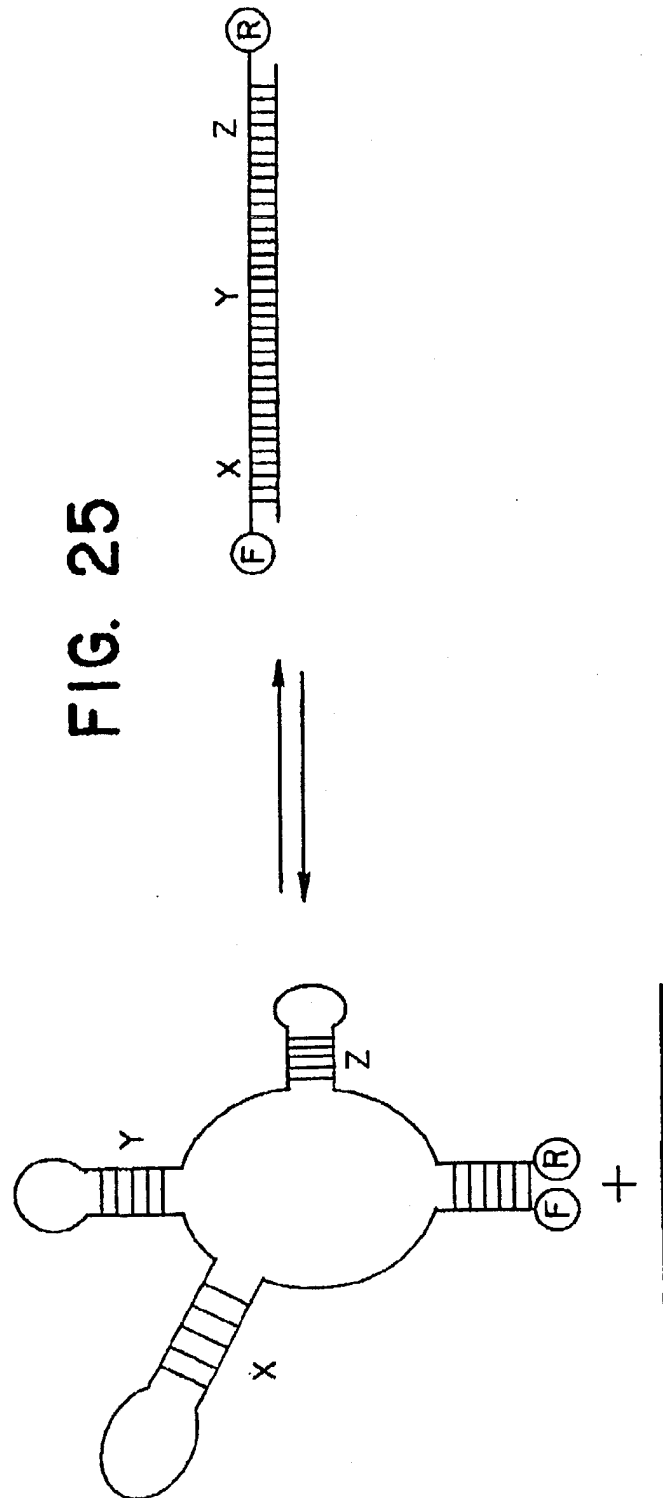
(59)

特表平 10-509053

FIG. 24

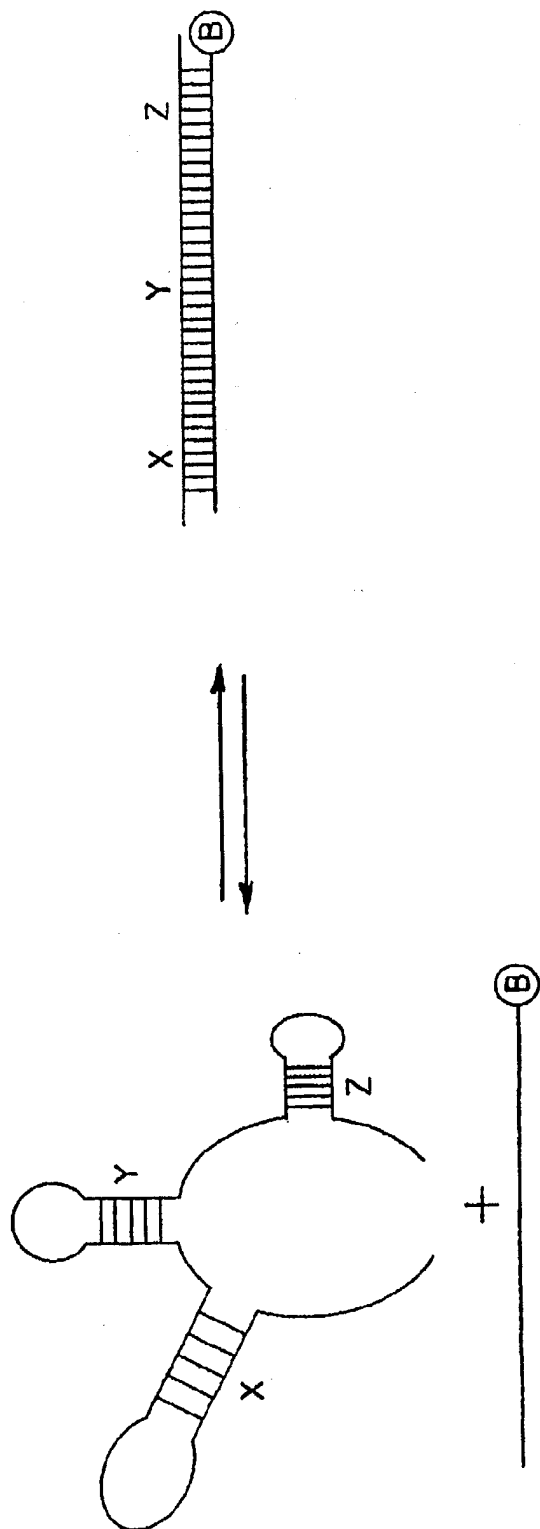


【図25】



【图 26】

FIG. 26

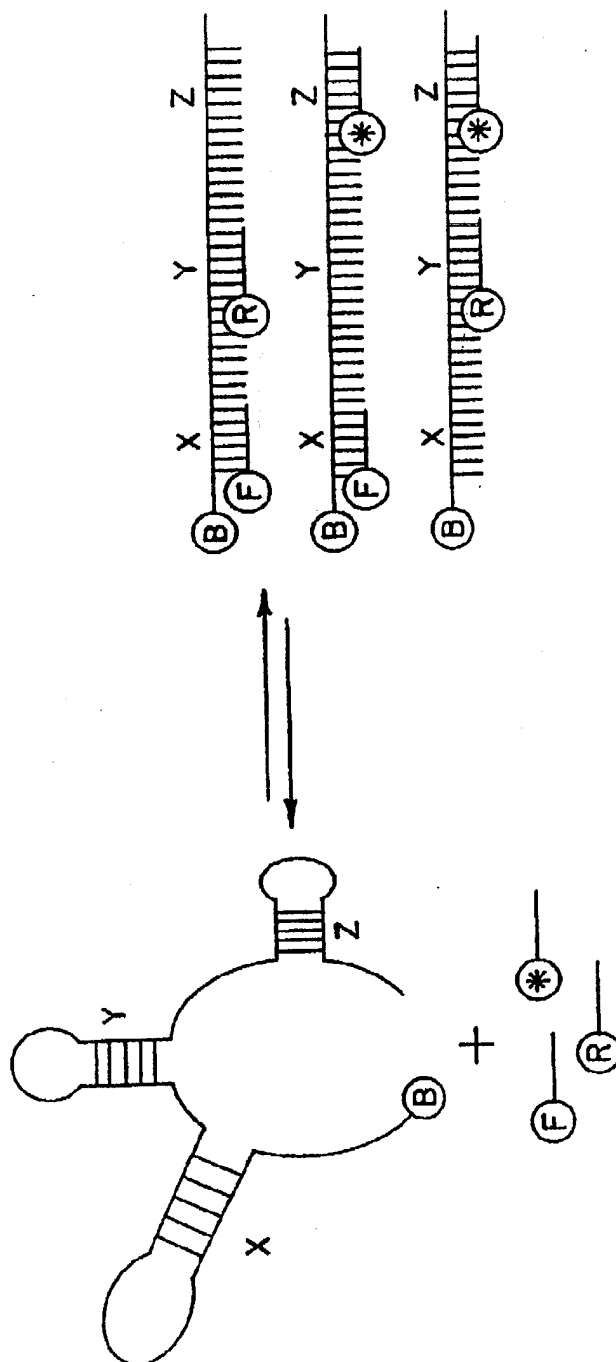


(61)

特表平10-509053

【图 27】

FIG. 27



(62)

特表平10-509053

【図28】

図28A

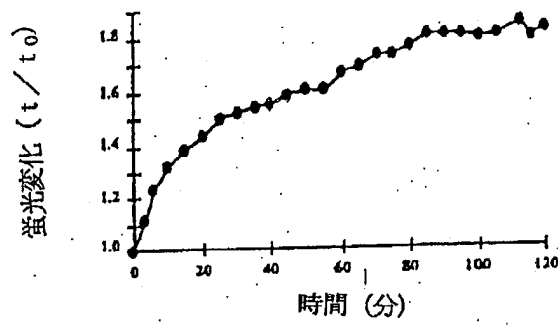
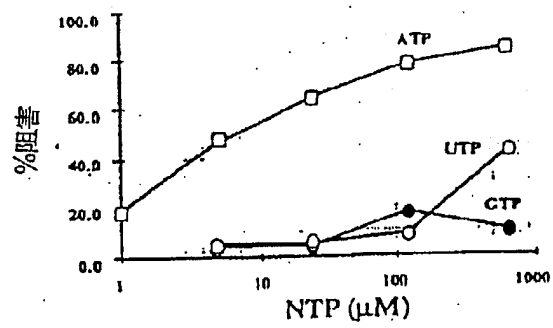


図28B





## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/14729

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C07H 21/02, 21/04; C12Q 1/68; G01N 33/48 US CL : 435/6; 436/94; 536/24.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6; 436/94, 501, 800, 804; 536/24.3, 25.32 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, STN (Medline, CaPlus, Scisearch, WPIDS, Disseb, Biosis) Search Terms: RNA, conformation, folding, secondary structure, oligonucleotide, hybridization, detection		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,496,938 A (GOLD et al) 05 March 1996, Column 8, lines 15-55.	1-9
Y	BAUMANN, et al. Complexes of DNA hairpins and a single-stranded oligonucleotide detected by affinity chromatography and mung bean nuclease cleavage. Eur. J. Biochem. 1987, Vol. 170, pages 267-272, especially pages 268-269	1-9
Y	GASSEN, H.G. Ligand-Induced Conformational Changes in Ribonucleic Acids. Prog. Nuc. Acid Res. 1980, Vol. 24, pages 57-83, especially pages 71-77.	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to undermind the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 NOVEMBER 1996		Date of mailing of the international search report 02 DEC 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer CHERYL A. LILJESTRAND Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/14729

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DRAPER, et al. Melting Studies of RNA Unfolding and RNA-Ligand Interactions. Meth. Enzymol. 1995, Vol. 259, pages 281-305, especially pages 294-305.	1-9
A	SANFORD, et al. Immunochemical detection of multiple conformations within a 36 base pair oligonucleotide. Nuc. Acids Res. 1988, Vol. 16, No. 22, pages 10643-10655, especially pages 10652-10655.	1-9
A, P	US 5,514,546 A (E. KOOL) 07 May 1996, column 3, lines 29-56.	1-9
A, P	US 5,561,222 A (KEENE, et al) 01 October 1996, column 2, lines 55-67 and column 3, lines 1-26.	1-9

---

フロントページの続き

(72)発明者 リリー, ジェームズ・ダブリュー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02181,  
ウェルズリー, グリーンウッド・ロード・  
9

(72)発明者 バクラ, アンドリュー・エー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02173,  
レシキントン, ノーマンディー・ロード・  
26